

**CAROLINA CAMARGO DE OLIVEIRA**

**ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E DAS RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE  
MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS PELO CANOVA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dorly de Freitas Buchi  
Co-orientador: Prof Dr Marco Aurélio Krieger

**CURITIBA**

**2006**

**CAROLINA CAMARGO DE OLIVEIRA**

**ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E DAS RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE  
MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS PELO CANOVA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular, Setor de  
Ciências Biológicas, Universidade Federal do  
Paraná, como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutor em Biologia Celular e  
Molecular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dorly de Freitas Buchi  
Co-orientador: Prof Dr Marco Aurélio Krieger

**CURITIBA**

**2006**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos camundongos, pois sem eles esse trabalho não seria possível.

Em segundo lugar a Dorly por me orientar sempre que possível, tanto dentro do laboratório quanto fora dele. Por toda sua dedicação quando estava lendo e corrigindo meus trabalhos durante feriados, pelas muitas conversas e ataques de risos em viagens a congressos, enfim, por tudo que passamos nesses 7 anos de convivência.

Ao Felipe, por estar sempre ao meu lado, por me incentivar, acreditar no meu potencial e por compartilhar comigo todos os bons e maus momentos da vida.

A todos que passaram pelo laboratório, desde os alunos de iniciação científica aos de mestrado e doutorado, que me auxiliaram em meus experimentos, que estavam presentes nas brincadeiras e broncas, fazendo de nossa convivência diária uma experiência agradável...

Em especial à Simone, por toda a sua ajuda, pela amizade, pelas discussões científicas, em fim, por tudo o que passamos juntas nesses anos.

Agradeço também a todos os meus amigos e amigas, que estando longe ou perto, sempre foram amigos no melhor sentido da palavra. Não nomeá-los-ei, pois todos sabem o que cada um significa para mim!

Gostaria de agradecer também:

Ao Canova do Brasil pelo apoio financeiro, pela doação dos medicamentos e por confiarem a nós uma parte tão importante, a credibilidade e comprovação científica.

Às secretárias Gerizalda do departamento de Biologia Celular e Marlene do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, pelo auxílio nas questões administrativas.

Ao pessoal do biotério da UFPR: Izelen, Júlio, Luís, Cândido e demais funcionários por todo o apoio técnico.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica, especialmente a Matilde e Regina pela ajuda prestada e ao Prof Ney pelos ensinamentos fundamentais para a utilização dos microscópios de varredura e transmissão.

Ao Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, por permitir a utilização do leitor de microplacas, especialmente à Mara por dispor de seu tempo e boa vontade para me auxiliar na utilização desse equipamento.

Ao Prof Dr Sílvio Sanches Veiga, por permitir o uso de seu laboratório e equipamentos, e aos seus alunos por sanarem minhas dúvidas sempre que precisei.

À Profª Drª Maria Benigna M. de Oliveira por permitir o uso de seus equipamentos e reagentes quando necessário.

Ao pessoal do IBMP, em especial ao Marco por me co-orientar, à Viviane e ao Christian pelo auxílio nos experimentos de expressão gênica.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida durante o período da realização de minha tese e à Secretaria de Ciência e Tecnologia pela concessão de recursos para a pesquisa, tornando financeiramente viável todos experimentos.

Enfim agradeço a todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram com esse trabalho.

Em um largo rio, de difícil travessia, havia um barqueiro que atravessava as pessoas de um lado para o outro. Em uma das viagens, iam um advogado e uma professora. Como quem gosta de falar muito, o advogado pergunta ao barqueiro: Companheiro, você entende de leis? Não – responde o barqueiro. E o advogado compadecido: É pena, você perdeu metade da vida! A professora muito social entra na conversa: Seu barqueiro, você sabe ler e escrever? Também não – responde o remador. Que pena! – condói-se a mestra – Você perdeu metade da vida! Nisso chega uma onda bastante forte e vira o barco. O canoeiro preocupado, pergunta: Vocês sabem nadar? Não! – responderam eles rapidamente. Então é uma pena – concluiu o barqueiro – Vocês perderam toda a vida!

“Não há saber mais ou saber menos: Há saberes diferentes.”

Paulo Freire

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMO</b>	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>3</b>
2.1. HOMEOPATIA	3
2.2. SISTEMA IMUNITÁRIO	5
2.2.1. MACRÓFAGOS (Mφ)	7
2.2.1.1. Processo de ativação de Mφ	10
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>12</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
3.1. OBJETIVO GERAL	13
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>14</b>
4.1. ANIMAIS	14
4.2. TRATAMENTO <i>IN VIVO</i>	14
4.3. TRATAMENTO <i>IN VITRO</i>	15
4.4. CULTIVO CELULAR	15
4.5. CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL PARA NAD(P)H OXIDASE	15
4.6. DETECÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	16
4.7. DETECÇÃO DE ANION SUPERÓXIDO (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	18

4.8. DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)	19
4.9. IMUNOMARCAÇÃO PARA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL (iNOS)	20
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4.11. LARANJA DE ACRIDINA	21
4.12. DETECÇÃO DE CD 74 (II) EM CITOMETRIA DE FLUXO	21
4.13. DETECÇÃO DE CD 74 (II) EM MET	21
4.14. MENSURAÇÃO DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE	22
4.15. EXPRESSÃO GÊNICA	22
4.16. IMUNOFENOTIPAGEM	23
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>24</b>
5.1. PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E DE NITROGÊNIO (RNS)	25
5.2. LARANJA DE ACRIDINA	36
5.3. DETECÇÃO DE CD74(II)	39
5.4. DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS	42
5.5. EXPRESSÃO GÊNICA	44
5.5.1. PROCESSOS TRANSCRICIONAIS E TRADUCIONAIS	55
5.5.2. DINÂMICA E ESTRUTURA CELULAR	56
5.5.3. RESPOSTA IMUNITÁRIA	58
5.5.4. PROTEÍNAS RELACIONADAS AO ESTRESSE: CITOPROTETORES	59
5.5.5. ENZIMAS	61
5.5.6. RECEPTORES DE QUIMIOCINAS E SEUS LIGANTES	63
5.5.7. OUTROS RECEPTORES	64
5.5.8. GENES INDUZIDOS POR IFN	65
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>66</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO 1 – ANIMAIS E TRATAMENTO</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO 2 – PREPARO DO CULTIVO CELULAR</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO 3 – CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL PARA NAD(P)H OXIDASE</b>	<b>83</b>
<b>ANEXO 4 – DETECÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</b>	<b>84</b>
<b>ANEXO 5 – DETECÇÃO DE ANION SUPERÓXIDO (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)</b>	<b>85</b>

<b><u>ANEXO 6 – DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)</u></b>	<b><u>86</u></b>
<b><u>ANEXO 7 – IMUNOMARCAÇÃO PARA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL (INOS)</u></b>	<b><u>87</u></b>
<b><u>ANEXO 8 – FIXAÇÃO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)</u></b>	<b><u>88</u></b>
<b><u>ANEXO 9 – PROCESSAMENTO PARA MET</u></b>	<b><u>89</u></b>
<b><u>ANEXO 10 – CONTRASTAÇÃO PARA MET</u></b>	<b><u>90</u></b>
<b><u>ANEXO 11 – LARANJA DE ACRIDINA PARA MICROSCOPIA CONFOCAL</u></b>	<b><u>92</u></b>
<b><u>ANEXO 12 – DETECÇÃO DE CD74 (II) EM CITOMETRIA DE FLUXO</u></b>	<b><u>93</u></b>
<b><u>ANEXO 13 – DETECÇÃO DE CD74 (II) EM MET</u></b>	<b><u>94</u></b>
<b><u>ANEXO 14 – MENSURAÇÃO DE CITOCINAS EM SOBRENADANTE</u></b>	<b><u>95</u></b>
<b><u>ANEXO 15 – EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE CÉLULAS ANIMAIS</u></b>	<b><u>96</u></b>
<b><u>ANEXO 16 – DOSAGEM DE RNA/DNA PELA DENSIDADE ÓTICA (DO)</u></b>	<b><u>98</u></b>
<b><u>ANEXO 17 – GEL DE RNA</u></b>	<b><u>99</u></b>
<b><u>ANEXO 18 – IMUNOFENOTIPAGEM</u></b>	<b><u>101</u></b>
<b><u>ANEXO 19 – APROVAÇÃO CEEA</u></b>	<b><u>102</u></b>



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b>	COMPONENTES DO MEDICAMENTO CANOVA.....	1
<b>FIGURA 2</b>	DIFERENCIAÇÃO, DISTRIBUIÇÃO E ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS <i>IN VIVO</i> .....	8
<b>FIGURA 3</b>	PAPEL DOS MACRÓFAGOS NA RESPOSTA IMUNITÁRIA E INFLAMATÓRIA - MECANISMOS DE AÇÃO.....	9
<b>FIGURA 4</b>	MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS.....	24
<b>FIGURA 5</b>	CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL PARA NAD(P)H OXIDASE..	27
<b>GRÁFICO 1</b>	PRODUÇÃO DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	28
<b>GRÁFICO 2</b>	PRODUÇÃO DE O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	30
<b>GRÁFICO 3</b>	PRODUÇÃO DE NO.....	32
<b>FIGURA 6</b>	IMUNOMARCAÇÃO PARA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL (iNOS).....	33
<b>FIGURA 7</b>	DESENHO ESQUEMÁTICO RESUMINDO OS EFEITOS DO CANOVA.....	35
<b>FIGURA 8</b>	MARCAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA.....	38
<b>GRÁFICO 4</b>	DETECÇÃO DE CD74 (li).....	40
<b>FIGURA 9</b>	IMUNOMARCAÇÃO PARA CD74 (li).....	41
<b>GRÁFICO 5</b>	PRODUÇÃO DE CITOCINAS.....	43
<b>GRÁFICO 6</b>	SAM PLOT DE COMPARAÇÃO DOS GRUPOS.....	46
<b>GRÁFICO 7</b>	SAM PLOT DE COMPARAÇÃO DOS GRUPOS.....	47
<b>FIGURA 18</b>	IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS.....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	DEGs ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS N X H.....	48
<b>TABELA 2</b>	DEGs ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS N X HS.....	48
<b>TABELA 3</b>	DEGs ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS H X HS.....	49
<b>TABELA 4</b>	DEGs AUMENTADOS ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS CA X HS.....	49
<b>TABELA 5</b>	DEGs DIMINUÍDOS ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS CA X HS.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS – Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida  
APC – Célula Apresentadora de Antígenos  
CA – Canova  
DEGs – genes diferencialmente expressos  
FDR – taxa de falsa seleção  
GM-CSF – Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos/Macrófagos  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio  
IFN- $\gamma$  – Interferon  $\gamma$   
IL – Interleucina  
iNOS – Óxido Nítrico Sintase induzível  
M $\phi$  – Macrófago(s)  
M-CSF – Fator Estimulador de Colônia de Monócitos/Macrófagos  
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão  
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade  
NK – *Natural Killer*  
NO – Óxido Nítrico  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – Nitrito  
NOS – Óxido Nítrico Sintases  
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio  
SOD – Superóxido desmutase  
TGF- $\beta$  – Fator de Transformação de Crescimento  $\beta$   
Th1 - Linfócitos T helper 1  
Th2 - Linfócitos T helper 2  
TNF $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

## RESUMO

Canova (CA) é um medicamento derivado das tinturas de: *Aconitum*, *Bryonia*, *Thuya*, *Lachesis* e *Arsenicum* diluídos em água destilada e menos de 1% de álcool. Preparado a partir de técnicas homeopáticas, não apresenta toxicidade nem efeitos colaterais. CA tem sido indicado a pacientes onde o sistema imunitário está debilitado, e vem apresentando bons resultados na clínica. Experimentos anteriores em nosso laboratório comprovaram que macrófagos tratados com CA apresentam-se ativados. Portanto, com esse trabalho pretendemos elucidar algumas modificações celulares ocorridas durante o tratamento com CA. Foram utilizados dois tipos de tratamento: camundongos tratados (*in vivo*) e macrófagos peritoneais de camundongos tratados com CA (*in vitro*). Os macrófagos foram coletados e processados para experimentos de detecção da atividade enzimática, assim como seus produtos (microscopia eletrônica de transmissão – MET, leitura de absorbância e marcação com laranja de acridina), detecção de CD74 (li) através de citometria de fluxo e MET, produção de citocinas através de citometria de fluxo e expressão gênica, através do isolamento de RNA e sua hibridização em Gene Chips®. Os macrófagos tratados com CA apresentaram aumento da atividade da NADH oxidase e da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), aumentando conseqüentemente a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) respectivamente. Observou-se o aumento da quantidade de vesículas ácidas e a diminuição da expressão do CD74 (li). Foram observadas diminuições na produção das interleucinas 2 (IL-2) e 4 (IL-4). Genes diferencialmente expressos (DEGs) foram observados nas células de camundongos tratados com CA. Esses genes estão principalmente relacionados com: processos de transcrição/tradução, estrutura/dinâmica celular, resposta imunitária, citoproteção, processos enzimáticos e receptores/ligantes. A partir dessas análises podemos concluir que o CA provoca reações celulares que envolvem desde ativação da produção de determinadas moléculas até alterações no perfil de expressão de genes relacionados com a ativação de macrófagos.

Palavras-Chave: Canova, macrófagos, metabolismo oxidativo, expressão gênica.

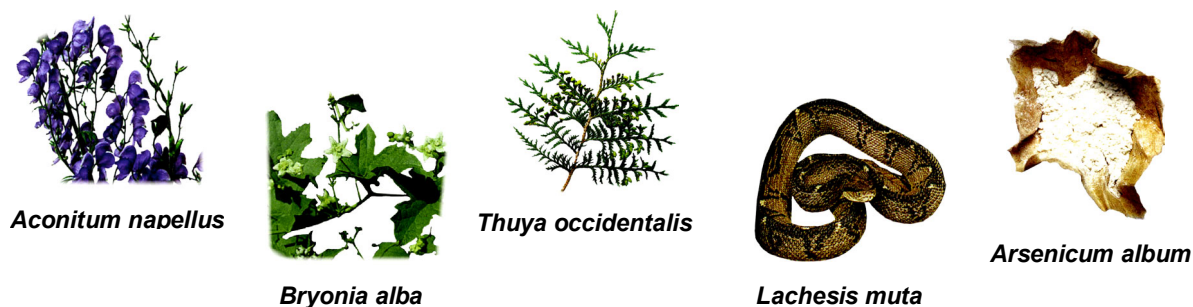
## ABSTRACT

Canova (CA) is a medication composed of *Aconitum*, *Bryonia*, *Thuya*, *Lachesis* and *Arsenicum* in distilled water containing less than 1% ethanol. It is produced with homeopathic techniques and is neither toxic nor presents collateral effects. CA is being used by patients where the immune system is depressed, presenting good clinical results. Previous studies demonstrated that CA activates macrophages. Therefore with this work we try to elucidate some cellular modifications triggered by CA. Two treatment types were performed: mice treated (*in vivo*) and mice macrophages treated with CA (*in vitro*). Peritoneal cells were collected and processed to enzymatic activity detection and release of its products (transmission electron microscopy – MET, absorbance reading, and acridine orange staining), CD74 (li) expression by flow citometry and MET, cytokine production by flow cytometry and gene expression, by RNA isolation and its hybridization into Gene Chips®. Macrophages triggered with CA increased NAD(P)H oxidase activity as well as that of inducible nitric oxide syntase (iNOS), consequently producing reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) respectively. We observed an increase in acid vesicles and a decrease in CD74 (li) expression. We also found a decrease in interleukin 2 (IL-2) and 4 (IL-4) production. Differently expressed genes (DEGs) were observed in cells from the treated group. These genes are mainly involved in transcription/translation, cell structure and dynamics, immune response, cytoprotection, enzymatic process and receptors/ligands. From these analyses we can conclude that CA triggers cellular reactions that involve activation of specific molecules production and alterations in gene expression profile related with macrophages activation.

Key words: Canova, macrophages, oxidative metabolism, gene expression

## 1. INTRODUÇÃO

O Canova (CA) é um medicamento comercial formulado a partir de técnicas homeopáticas Hahnemannianas. Esse medicamento possui em sua composição *Aconitum napellus* 11 dH (Ranunculaceae), *Thuja occidentalis* 19 dH (Cupresaceae), *Bryonia alba* 18 dH (Cucurbitaceae), *Arsenicum album* 19 dH (arsenic trioxide), *Lachesis muta* 18 dH (Viperidae) e menos de 1% de álcool diluídos em água destilada. Originário da Argentina, foi trazido ao Brasil pelo Laboratório Canova do Brasil que detém a patente internacional do medicamento desde 8 de maio de 2001, o que garante os direitos de produção e comercialização do Canova no Brasil e em outros países. Sua preparação e comercialização são regidas pela Lei nº 6360 de 23/09/76, em seu artigo 23, alíneas I e II, parágrafo único, e regulamentada pelo decreto nº 79094 de 05/01/77, em seu artigo 28, alíneas I e IV, parágrafo único, que determinam que sejam fornecidos ao Ministério da Saúde, informações e dados elucidativos sobre seus produtos (Canova do Brasil, 2006). O medicamento é manipulado e vendido por farmácias autorizadas. O CA é produzido e comercializado nas formas de gotas, inalante e flaconetes, sob rigoroso controle de qualidade, sendo vendido apenas sob prescrição médica.



**FIGURA 1 – COMPONENTES DO MEDICAMENTO CANOVA.**

A ação do CA vem sendo estudada desde 1997. Constatou-se que esse medicamento estimula o sistema imunitário através da ativação de macrófagos ( $M\phi$ ), favorecendo a resposta imunológica do próprio organismo em vários estados patológicos. Estudos *in vitro* demonstraram que o medicamento CA não apresenta toxicidade nem mutagenicidade identificável em nível cromossômico (Seligmann et al., 2003). Piemonte e Buchi em 2002, demonstraram que o CA ativa macrófagos

tanto *in vitro* quanto *in vivo* em experimentos realizados com células peritoneais de camundongos. Esses experimentos também mostraram uma significativa diminuição na produção do Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). A produção de óxido nítrico encontra-se aumentada em M $\phi$  tratados com CA na presença ou ausência de microrganismos. A atividade fagocítica também é modificada pelo medicamento. M $\phi$  tratados *in vitro* apresentam aumento na atividade fagocítica de microrganismos não infectivos (*Saccharomyces cerevisiae* e *Trypanosoma cruzi* epimastigotas) e diminuição na atividade fagocítica dos microrganismos infectivos *T. cruzi* tripomastigotas e *Leishmania amazonensis* (Godoy, 2002). O CA estimula o sistema endosomal/lisosomal, aumentando a atividade da enzima fosfatase ácida (Lopes et al., 2006). Efeitos modulatórios também foram encontrados em infecção experimental tanto *in vitro* quanto *in vivo* por *L. amazonensis*, controlando a progressão e limitando a sua disseminação (Pereira et al., 2005). Estudos com camundongos portadores de Sarcoma 180 tratados com CA mostraram a redução da massa tumoral e o aumento significativo do infiltrado linfocitário, do tecido granuloso e de fibrose peritumoral. O aumento dos linfócitos T CD4, B e *natural killer* (NK) também foi observado nesses animais (Sato et al., 2005). O estudo *in vitro* de células de medula óssea de camundongos demonstrou que as células aderentes CD11b<sup>+</sup> apresentaram morfologia de células ativadas após o tratamento com CA. A presença do medicamento também permitiu a formação de ninhos de células em proliferação e/ou diferenciação (Abud et al., 2006). Estudos clínicos realizados com pacientes HIV positivos demonstraram a diminuição das doenças oportunistas pelo CA, devido à sua capacidade modulatória do sistema imunitário, assim como o aumento na qualidade de vida desses pacientes (Sasaki et al., 2001; Di Bernardi, 2005; Stroparo, 2005).

Devido ao seu caráter imunomodulador, o CA é indicado para pacientes portadores de doenças depressoras do sistema imunitário, como por exemplo hepatite, neoplasias e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Estudos com esse medicamento tornam-se necessários para contribuir no conhecimento de sua ação no sistema imunitário.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Homeopatia

A homeopatia é um sistema terapêutico criado pelo médico alemão Samuel Christian Hahnemann (1755-1843) no final do século 18. O termo homeopatia é originado de *Pathos*, vocábulo grego que corresponde a sofrimento, e *Homoios* que significa semelhante (Ruiz, 1999). A homeopatia utiliza uma série de substâncias derivadas de plantas, animais, minerais, substâncias químicas sintéticas ou drogas convencionais, todas em quantidades mínimas, usando um processo de preparação especial (Jonas e Jacobs, 1996) com repetidas diluições e sucussões (agitação vigorosa) (Jonas, Kaptchuk, Linde; 2003). O poder curativo, segundo Hahnemann, se manifestaria com a menor dose possível do medicamento dinamizado, de modo que a dose contivesse, quase que exclusivamente, só a força medicamentosa pura, livremente desenvolvida, do tipo não material, produzindo apenas dinamicamente efeitos tão poderosos que nunca seriam obtidos com a substância medicamentosa pura, mesmo que ingerida em grandes quantidades (Ruiz, 1999).

Para os céticos, a homeopatia é um método de tratamento arcaico e inofensivo, com modo de ação não plausível. Em contraste, experiências individuais e coletivas de homeopatas profissionais nos mostram um quadro convincente da sua efetividade na clínica (Mathie, 2003). Estudos têm sido desenvolvidos visando um melhor entendimento da homeopatia. Em termos bioquímicos é convencionalmente entendido como atuam as drogas convencionais, porém a homeopatia apresenta um enorme desafio intelectual, se não um completo impasse. Muitos cientistas têm sugerido que os efeitos clínicos dos medicamentos homeopáticos são devidos apenas ao efeito placebo. Entretanto, estudos rigorosos, com replicatas de forma duplo-cega e aleatórias, têm sido realizados mostrando diferenças significativas entre homeopatia e placebo (Vickers e Zollman, 1999).

Alguns dos primeiros experimentos laboratoriais com diluições homeopáticas muito baixas foram realizados por um proeminente patologista britânico, William Boyd, que realizou uma série de experimentos laboratoriais na década de 30, demonstrando os efeitos dos preparados homeopáticos do elemento mercúrio nos padrões de crescimento do lêvedo (Boyd, 1941, 1946, 1947, 1954 *apud* Jonas e



Jacobs, 1996). A *Atropa belladonna* (belladonna), que possui como princípio ativo a atropina, muito usada na medicina convencional, também tem sido estudada (Walach et al., 2001). Homeopaticamente, a belladonna é muito utilizada em processos inflamatórios, aumentando o sistema imunitário (Pedalino et al., 2004). Mitra, Kundu e Khuda Bukhsh em 1998, demonstraram que o *Arsenicum album* em forma homeopática potentizada atua reduzindo a acumulação de arsênico em órgãos vitais. A *Bryonia* sp é outro medicamento bem conhecido e estudado por sua atividade anti-reumática e expectorante (Krauze-Baranowska e Cisowski, 1995). Naser et al. em 2005, demonstraram a atividade antiviral e imunoestimuladora da *Thuya occidentalis*.

A homeopatia é um sistema de tratamento que coloca em ação os mecanismos de cura do próprio corpo, de forma abrangente. Devido à alta diluição, não apresenta efeitos tóxicos, produzindo pouco ou nenhum efeito colateral. A meta da terapia homeopática é promover e orientar a reação de autocura inata do corpo. Não é o medicamento em si que cura a doença, mas a reação dos mecanismos de cura do corpo ao medicamento que leva à melhora. Um organismo que elimina uma doença por conta própria tem mais chance de continuar saudável, realmente curando o problema e evitando a recorrência. Esse tipo de tratamento se dá de acordo com a velocidade de reparo natural do próprio corpo, portanto, pode levar mais tempo do que os tratamentos aos quais estamos acostumados. Os tratamentos convencionais são rápidos, mas também afetam as partes saudáveis do corpo, muitas vezes produzindo efeitos colaterais indesejados (Jonas e Jacobs, 1996).

Várias são as propostas de explicação para o mecanismo de ação da homeopatia. Essas incluem teorias baseadas no comportamento complexo de sistemas dinâmicos, mecânica quântica, teoria da informação e até parapsicologia e mágica (Fisher, 2003). Devido à falta de explicações científicas para seu modo de ação, a homeopatia é considerada por muitos médicos pesquisadores e cientistas como, no máximo, placebo terapia, apesar do fato que muitos pacientes têm relatado seus efeitos benéficos (Widakowich, 2000).

À medida que os dados se acumulam e que os debates surgem, algumas explicações começam gradualmente a ser corroboradas enquanto que outras são extintas (Fisher, 2003). Os possíveis mecanismos de ação ainda permanecem como teorias infundadas e seria importante se fossem provadas. Entretanto, o principal

agora seria evidenciar se a homeopatia realmente exerce efeito e qual sua especificidade. A chave do sucesso para qualquer estudo é obter resultados a partir de observações clínicas que reflitam propriamente a saúde da pessoa como um todo, o que tipifica a homeopatia. A qualidade de vida do paciente, por exemplo, deve ser tão importante quanto marcadores bioquímicos ou outros determinantes físicos do status de saúde. Afinal, em terapias holísticas como a homeopatia, um sintoma único normalmente não corresponde a uma doença, e sendo assim, é inadequado nesse tipo de estudo observar apenas as consequências específicas da doença (Mathie, 2003).

Fazem-se necessárias então pesquisas melhores e em maior número, livres de crenças ou descrenças no sistema em questão (Jonas, Kaptchuk e Linde, 2003). Talvez nossos pensamentos tenham sido dominados pela linearidade dos modelos derivados da farmacologia convencional. E sendo assim, nós podemos estar procurando por efeitos como na medicina alopática, ou pior, estamos apenas satisfeitos com esses tipos de efeitos. Uma coisa é certa, devemos melhorar, desenvolver e transmitir a efetividade da homeopatia (Fisher, 2003).

## **2.2. Sistema imunitário**

O organismo é constantemente ameaçado pela possível invasão de vários tipos de microrganismos como bactérias, vírus e parasitas, os quais quando violam a integridade do corpo podem prejudicar o delicado balanço interior. Para combater essas infecções, durante o processo evolutivo, um sistema imunitário altamente sofisticado foi desenvolvido, sendo responsável pelos mecanismos de defesa do organismo (Parkin e Cohen, 2001).

O sistema imunitário é composto por uma rede altamente interativa de órgãos linfóides, diferentes tipos de células, fatores humorais e citocinas espalhados pelo corpo (Wood e Austyn, 1993). Dentre as células do sistema imunitário estão os linfócitos, que reconhecem e respondem especificamente a antígenos estranhos, os fagócitos (macrófagos e neutrófilos) além das células NK. Barreiras físicas e químicas (pele, epitélio mucoso, etc) e as proteínas sanguíneas (complemento) também fazem parte do sistema imunitário. A organização anatômica e a capacidade

de intercambiar com o sangue, linfa e tecidos são muito importantes para a geração da resposta (Abbas, Lichtman e Pober, 2000).

Quando alguma barreira do nosso corpo é violada, o sistema imunitário é ativado e a resposta imunitária resultante geralmente leva à destruição e remoção do organismo estranho (Wood e Austyn, 1993). Para o sistema trabalhar corretamente três componentes são essenciais:

- sistema de reconhecimento, para identificar a presença de um corpo estranho. Esse reconhecimento ocorre em nível molecular através de várias moléculas de reconhecimento;
- sistema de remoção/eliminação, para matar ou eliminar a ameaça. Esse sistema ocorre em nível molecular e celular;
- sistema de comunicação, para coordenar as atividades de vários elementos, tanto de reconhecimento quanto de remoção/eliminação (Playfair, 1995).

O sistema imunitário pode responder a uma imensa variedade de organismos diferentes e uma enorme diversidade de respostas é possível (Wood e Austyn, 1993). De uma maneira mais ampla, os diferentes tipos de resposta imunitária enquadram-se em duas categorias: respostas inatas (ou não adaptativas) e respostas específicas (adaptativas ou adquiridas) (Roitt, Brostoff e Male, 1999).

A inata possui capacidade de distinção limitada, respondendo de maneira semelhante a qualquer agente. É responsável pela defesa inicial tendo papel importante na indução das respostas específicas. A imunidade específica possui alta especificidade para distintas moléculas além da memória imunológica, o sistema imunitário adquirido “lembra” de cada encontro com um antígeno estranho, de modo que os encontros subseqüentes estimulam mecanismos de defesa crescentemente eficazes. Linfócitos e os anticorpos são seus componentes principais. Esse tipo facilita os mecanismos protetores da inata, tornado-a mais eficaz além de acrescentar um alto grau de especialização aos relativamente estereotipados mecanismos da inata. As interações entre as imunidades são bidirecionais. Evidencialmente, os dois tipos de respostas são complementares. Como resultado da ação das células envolvidas na primeira linha de defesa (local da resposta inflamatória) os produtos da quebra dos antígenos são levados por uma célula apresentadora de antígenos (APC), através do sistema linfático aferente, ao linfonodo mais próximo. Nesse, linfócitos T ou B que migraram para o linfonodo

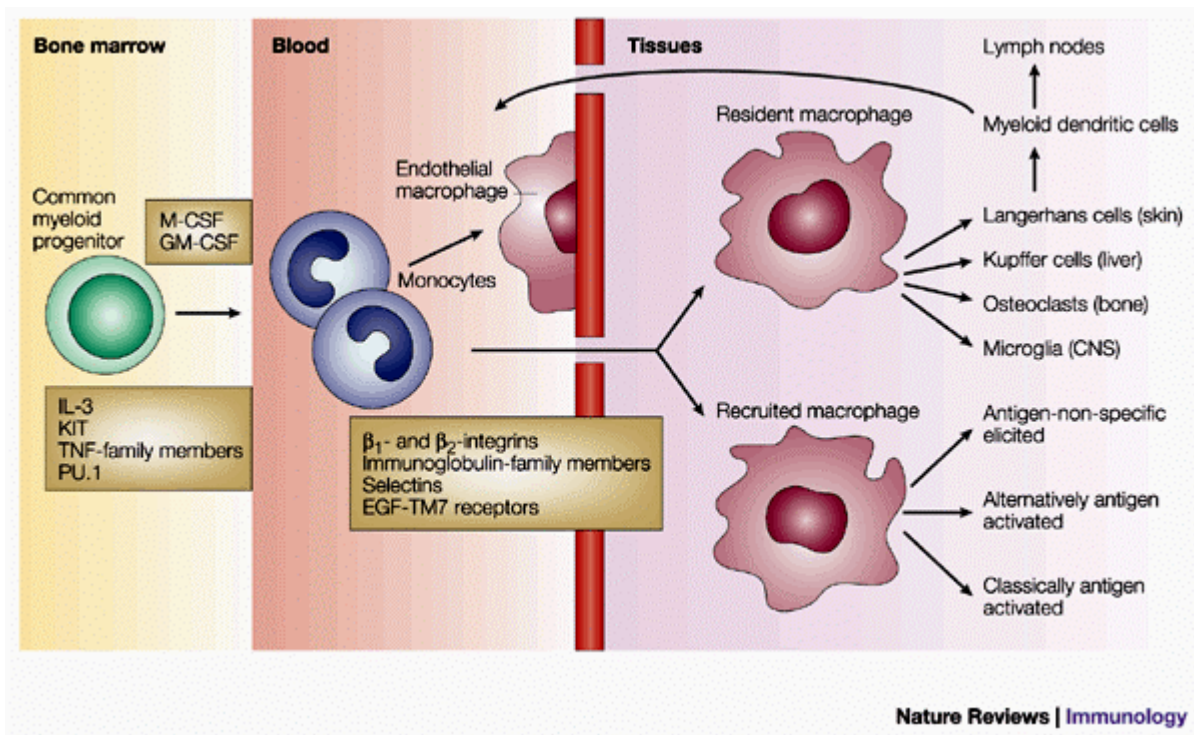
interagem com o antígeno apresentado, originando moléculas efetoras como os anticorpos e células efetoras como células T citotóxicas. Através do sistema linfático eferente essas células e moléculas alcançam a circulação sistêmica de onde elas podem extravasar até o local da infecção para eliminar efetivamente a fonte da infecção (Marsh e Kendall, 1996). Em outro tipo de interação, alguns fagócitos podem capturar antígenos e apresentá-los aos linfócitos T, que por sua vez liberam fatores solúveis (citocinas) que ativam os fagócitos, e estes então destroem os patógenos capturados (Roitt, Brostoff e Male, 1999).

### **2.2.1. Macrófagos ( $M\phi$ )**

O macrófago foi descrito por Metchnikoff no final do século dezenove, como uma célula com capacidade fagocitária. A compreensão da importância dessas células e sua ativação clássica foram descritas a partir de estudos de MacKanness et al. no início dos anos 60, onde foi demonstrada sua atividade antimicrobiana (Gordon, 2003).

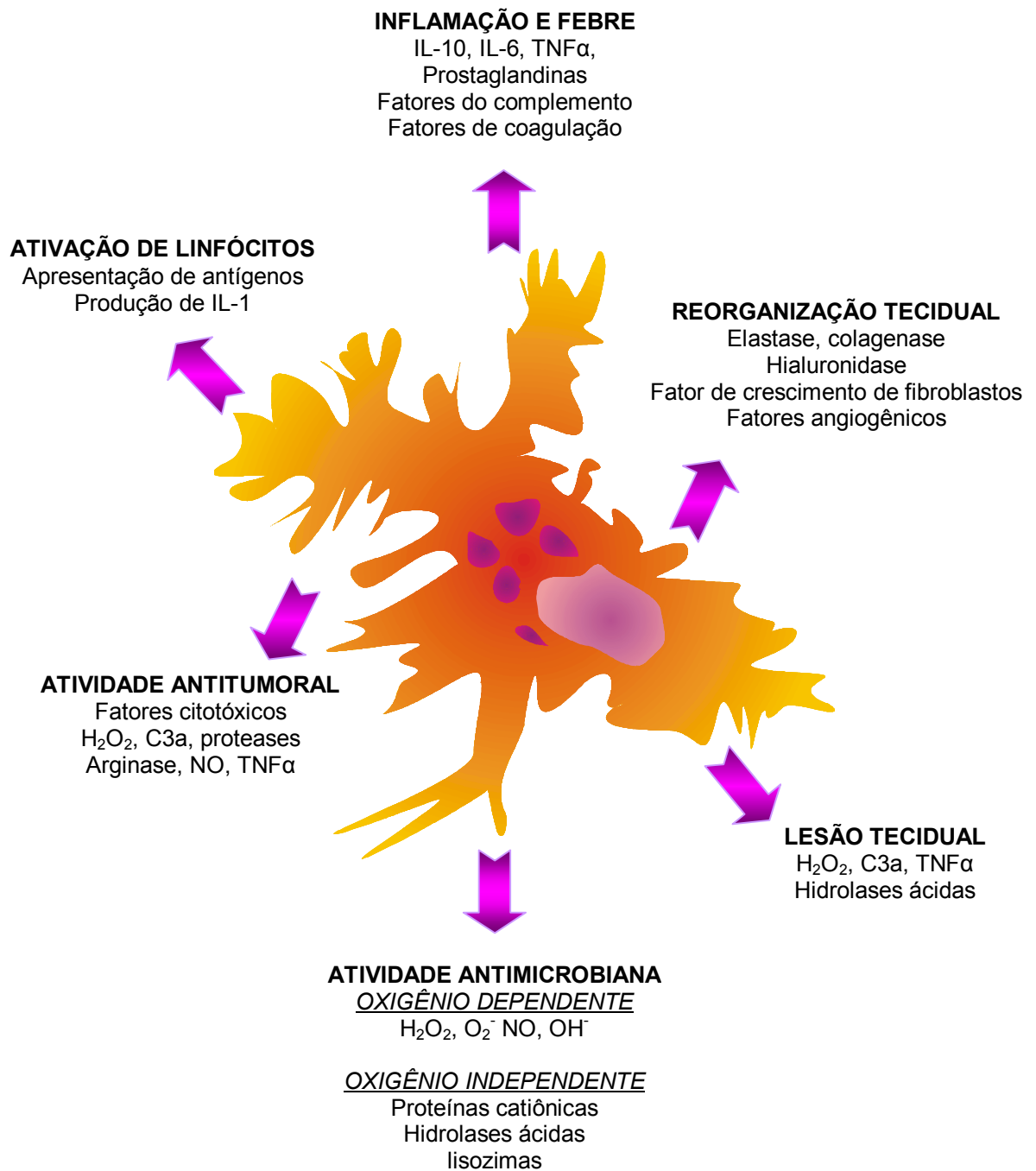
Os  $M\phi$  são originados de células tronco hematopoiéticas pluripotentes, as quais são capazes de produzir diferentes células em resposta a uma variedade de sinais. O crescimento e a diferenciação dos  $M\phi$  é dependente de citocinas determinadoras de linhagens como, por exemplo, o fator estimulador de colônia de monócitos/macrófagos (M-CSF), o fator estimulador de colônia de granulócitos/macrófagos (GM-CSF) e interações com o estroma em órgãos hematopoiéticos (Gordon, 2003). Os precursores mielóides comprometidos se diferenciam para formar os monócitos sanguíneos. Essas células imaturas irão adquirir características de  $M\phi$  residentes assim que emigrarem da circulação para os tecidos (Hume, 2006).

Os  $M\phi$  estão envolvidos em muitos processos diferentes, como por exemplo, remodelamento tecidual durante a embriogênese, cicatrização, remoção de células mortas ou danificadas após injúria ou infecção, hematopoiese e homeostase. Outra função dos  $M\phi$  é a de servirem como células apresentadoras de antígenos para o reconhecimento inicial e remoção de células senescentes, microrganismos e células tumorais (Klimp et al., 2002).



**FIGURA 2 – DIFERENCIAÇÃO, DISTRIBUIÇÃO E ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS *IN VIVO*.** Fonte: Gordon, 2003.

A idéia de que os M $\phi$  são importantes na resposta imunitária foi reforçada nos anos 70, quando foi descoberto que M $\phi$  apresentavam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, que são necessárias para o reconhecimento de antígenos pela célula T (Unanue e Allen, 1987). Além disso, são importantes na interação bidirecional das respostas imune inata e específica. As funções dos M $\phi$  na resposta inata complementam suas contribuições nas respostas adquiridas humoral e celular, nas quais eles regulam a ativação de linfócitos B e T. Os M $\phi$  apresentam funções nas fases de reconhecimento, ativação e efetora da imunidade específica. Entre essas se encontra a de célula processadora e apresentadora de antígenos, produtora de citocinas como a IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$  além da função de fagocitose de células apoptóticas e necróticas. Agindo diretamente ou sob influência de outras células do sistema imunitário, os M $\phi$  capturam patógenos, eliminam invasores e os encaminham para os subcompartimentos apropriados dos órgãos linfóides (Gordon, 1999).



**FIGURA 3** – PAPEL DOS MACRÓFAGOS NA RESPOSTA IMUNITÁRIA E INFLAMATÓRIA - MECANISMOS DE AÇÃO Fonte: adaptado de Roitt, Brostoff e Male, 1999.

### **2.2.1.1. Processo de ativação de M $\phi$**

Normalmente, a ativação de M $\phi$  não é uma propriedade constitutiva, mas sim uma propriedade adquirida por essas células após a exposição a um estímulo. Esse processo pode ser definido como aquisição de novas moléculas e capacidades celulares que são requeridas na execução das complexas funções associadas à ativação (Ohmori e Hamilton, 1994).

Até alguns anos atrás, M $\phi$  ativados eram simplesmente definidos como células que secretavam mediadores inflamatórios e eliminavam patógenos intracelulares. Hoje em dia, M $\phi$  ativados podem ser um grupo de células bem mais heterogêneo, com fisiologias diferentes e que executam funções imunológicas distintas (Mosser, 2003). A morfologia celular também varia consideravelmente com os diferentes estados funcionais. Quando as células passam de residentes para ativadas, elas modificam sua morfologia adquirindo núcleo grande e eucromático, pronunciadas projeções celulares, aumentada capacidade de proliferação, habilidades para aderir e espalhar-se em substratos, de fagocitose, de fusão de lisossomos com vacúolos endocíticos e de produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (North, 1978). Uma notável consequência da ativação de macrófagos é o grande aumento da expressão de moléculas de classe II do MHC pelas células. Isto presumivelmente potencializa sua interação com células T helper ativadas durante a resposta imunitária adaptativa (Wood e Austyn, 1993).

Hoje em dia, pelo menos três populações distintas de M $\phi$  ativados são descritas, e cada tipo celular parece exercer papéis biológicos diferentes. O primeiro e mais bem descrito é o M $\phi$  ativado clássico, cujo papel é de célula efetora na resposta imunitária celular (Mosser, 2003). Esse tipo celular torna-se ativado após a exposição ao interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), produzido por linfócitos T helper-1 (Th1) e células NK e por uma rede de citocinas envolvendo a IL-12 e a IL-8, produzida por APCs (Gordon, 2003). Além disso, o TNF age como um sinal secundário nesse tipo de ativação. M $\phi$  ativados clássicos possuem habilidade aumentada de matar e degradar microrganismos devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e do aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), produzindo, conseqüentemente, óxido nítrico (NO) (Mosser, 2003).

O segundo tipo, o alternativamente ativado, parece estar envolvido na imunossupressão e reparo tecidual (Mosser, 2003). São normalmente induzidos por IL-4 e glicocorticóides assim como por outras citocinas como IL-10, IL-13 e por fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), produzindo efeitos semelhantes. Os M $\phi$  alternativamente ativados expressam características fenotípicas e moleculares que diferem consideravelmente dos M $\phi$  ativados clássicos. Preferencialmente, eles expressam receptores para manose,  $\beta$ -glucana, *scavenger* tipo 1 e CD163. Apesar do aumento na capacidade endocítica, esse tipo celular não apresenta aumento nas funções de eliminação de microorganismos, pois a produção de NO e ROS encontra-se suprimida (Goerdts e Orfanos, 1999).

O mais recente tipo adicionado a essa lista é o M $\phi$  ativado do tipo III, o qual tem função antiinflamatória e preferencialmente induz resposta imune do tipo humoral a antígenos. Normalmente são ativados após a ligação de receptores Fc $\gamma$ R com conseqüente produção de IL-12 e IL-10. Os M $\phi$  desse tipo induzem as células T helper-2 (Th2) a produzir IL-4 (Mosser, 2003).

A maioria dos métodos usados para identificar a ativação dessas células é baseada em algumas funções que estão aumentadas em M $\phi$  ativados, como por exemplo, síntese e secreção de enzimas. Uma vez que muitas dessas atividades funcionais requerem aumento da síntese protéica, pode-se considerar que o aumento do RNA celular possa ser usado como parâmetro para identificar células com capacidades funcionais aumentadas. RNA sintetizado por M $\phi$  implica no aumento da fagocitose por essas células e atividades bactericidas associadas com o desenvolvimento da imunidade célula-mediada, e processamento de antígenos (Stadler e Weck, 1978).



## 2. JUSTIFICATIVA

Hahnemann, fim de fevereiro de 1842, escreveu: “Parece que a funesta preocupação principal da velha medicina é de tornar senão mortal pelo menos incurável, a maioria das doenças crônicas, por meio de constantes enfraquecimentos e martírios do doente debilitado e já bastante sofredor, acrescentando-lhe novas doenças medicamentosas destruidoras”. Ainda hoje, início do terceiro milênio, a maioria dos tratamentos médicos, apesar de efetivos no controle das doenças, muitas vezes produzem efeitos colaterais indesejados.

O Canova está sendo utilizado no tratamento de doenças como o câncer e a AIDS e vem apresentando resultados clínicos positivos, aumentando a qualidade de vida dos pacientes, sem produzir efeitos colaterais. Devido a esses fatores tem-se a necessidade de um estudo mais detalhado sobre a atuação desse medicamento no organismo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo ampliar os conhecimentos sobre a ação do CA no organismo.

#### 3.2. Objetivos Específicos

Em macrófagos peritoneais de camundongos tratados *in vitro* e *in vivo* com CA:

- ⇒ Verificar a atividade da enzima NAD(P)H oxidase através de marcações eletrondensas em microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- ⇒ Quantificar a produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) utilizando a técnica do vermelho de fenol;
- ⇒ Quantificar a produção de anion superóxido ( $O_2^-$ ) utilizando a técnica de redução do citocromo c;
- ⇒ Quantificar a produção de óxido nítrico (NO) através da detecção de nitrito no sobrenadante utilizando reagente de Griess;
- ⇒ Detectar a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) através de MET;
- ⇒ Detectar a ativação *in vitro* dessas células utilizando laranja de acridina;
- ⇒ Detectar e quantificar a expressão do CD74 (li) em macrófagos tratados *in vivo*;
- ⇒ Detectar e quantificar a produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-5) em macrófagos de camundongos tratados *in vivo*;
- ⇒ Avaliar a expressão gênica, com o auxílio de microarranjos de DNA, a fim de verificar a expressão simultânea de diversos genes em macrófagos de camundongos tratados *in vivo*;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) com mais ou menos 3 meses de idade, pesando entre 25-30 g, cedidos pelo Biotério do setor de Ciências Biológicas (SCB) da UFPR. O número de animais utilizados por grupo em cada experimento foi determinado dependendo do número de células necessárias em cada experimento. Todas as recomendações da lei nacional (nº 6638, 5 de novembro de 1979) para manuseio de animais foram respeitadas e o projeto foi aprovado pela comissão de ética em experimentação animal (CEEAA) do SCB da UFPR (anexo 19).

### 4.2. Tratamento *in vivo*

Os animais utilizados para ensaios *in vivo* foram tratados durante sete dias. O número de animais tratados por grupo dependia do número de células necessárias em cada experimento. Foram utilizados camundongos divididos nos seguintes grupos:

- grupo tratado com Canova (CA): foram administradas injeções subcutâneas de 7 µl/g de Canova a cada 24 horas; OBS: o Canova foi sucussionado (agitado vigorosamente) antes de cada aplicação;
- grupo tratado com solução hidro-alcoólica sucussionada (HS): foram administradas injeções subcutâneas de 7 µl/g de solução hidro-alcoólica sucussionada estéril (água destilada mais 0,01% de álcool neutro) a cada 24 horas;
- grupo normal ou controle (N): não foi administrada nenhuma substância nestes animais.

No experimento de expressão gênica foram utilizados os grupos citados acima, e mais o seguinte grupo:

- grupo tratado com solução hidro-alcoólica (H): foram administradas injeções subcutâneas de 7 µl/g de solução hidro-alcoólica estéril (água destilada mais 0,01% de álcool neutro) a cada 24 horas;

#### **4.3. Tratamento *in vitro***

Em cultura de macrófagos peritoneais coletados a partir de camundongos normais não tratados, após 2 horas de cultivo, foram adicionados 10% da solução pesquisada em relação à quantidade de meio. Passadas mais 24 horas foi adicionado dose reforço de 1% das soluções.

#### **4.4. Cultivo celular**

Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. O peritônio foi exposto e foram administrados 10 ml de “Phosphate Buffer Solution” (PBS) gelado estéril. Com uma seringa, o lavado foi retirado e foi transferido a um tubo Falcon estéril, acondicionado em gelo para impedir a aderência das células à parede do tubo. Quando necessário, os tubos foram centrifugados durante 2 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante desprezado e os pellets ressuspensos. Uma alíquota foi retirada e as células contadas em Câmara de Neubauer. O número de células variou dependendo do experimento.

#### **4.5. Citoquímica ultraestrutural para NAD(P)H oxidase**

Para cada experimento do tratamento *in vivo*, foram utilizados pelo menos 5 camundongos para cada grupo, e após o período de tratamento, as células foram coletadas, colocadas para aderir durante 15 minutos a 37°C 5%CO<sub>2</sub>, e prontamente processadas.

Para o tratamento *in vitro*, as células coletadas, plaqueadas em garrafas de cultivo e tratadas com dose reforço, como descrito no item 4.3. Após o cultivo de 48 horas, as células foram processadas.

As células ( $5 \times 10^6$  células por garrafa) foram processadas conforme protocolo (anexo 3). As garrafas foram incubadas com o substrato da enzima (NAD(P)H) e cloreto de cério (CeCl<sub>3</sub>) em tampão Tris Maleato. Células de todos os grupos foram também incubadas em solução onde não foi adicionado o substrato da enzima. Esses grupos foram chamados de controle da enzima. Ao final, as células foram

raspadas das garrafas de cultivo e centrifugadas, sempre respeitando os grupos, sem misturá-los. Foi realizada então a pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2, durante aproximadamente uma hora no escuro. Foi realizada desidratação em acetona (70, 90 e 100%), infiltração em mistura de epon:acetona em série decrescente e emblocagem em epon. Após a polimerização em estufa à 60°C, os blocos foram cortados em ultramicrotomo e observados sem contrastação no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 EXII, do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR. As imagens foram adquiridas através do analisador de imagens Gatan. Foram observados cortes de células em gradinhas de cobre de 300 mesh. Estes foram obtidos através de cortes aleatórios, em intervalos de 0,5µ. A observação do material foi realizada de forma “duplo cego”, ou seja, as gradinhas estavam em códigos e o observador desconhecia a origem do material. As fotos foram obtidas através do sistema de análise de imagens GATAN.

#### **4.6. Detecção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

A coleta do lavado foi realizada como descrito acima (item 4.4) e foram realizados os dois tipos de tratamento. O lavado foi distribuído com o auxílio de uma micropipeta em placas de cultivo de 96 poços. Foram utilizados  $5 \times 10^5$  macrófagos por poço, que foram incubados por quinze minutos a 37°C 5% de CO<sub>2</sub> para a adesão nas placas. Para os experimentos *in vitro*, após esse tempo, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado meio de cultura “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal contendo penicilina 1 U/ml, estreptomicina 1 µg/ml, e anfotericina 2,5 µg/l. O cultivo foi realizado em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 48 horas após o devido tratamento. Para os experimentos *in vivo*, após os 15 minutos de aderência, as células foram processadas segundo cada protocolo específico. Foram realizados 3 experimentos em triplicata para cada tratamento.

A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi quantificada pelo método baseado na oxidação do vermelho de fenol pela H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dependente de peroxidase, segundo o método de Pick e Mizel, 1981 (anexo 4). Após o tempo de cultura ou os 15 minutos de aderências do

tratamento *in vivo*, as células foram lavadas duas vezes com HBSS (37°C). Foram adicionados 100µl de meio de incubação contendo vermelho de fenol a 1M e 15 U/ml de peroxidase dissolvidos em Hank's Buffer Salt Solution (HBSS) em todos os poços. Posteriormente, nos poços inferiores, foi ainda adicionado miristato forbol acetato (PMA) na concentração de 1µl/ml. O PMA foi utilizado como controle positivo, uma vez que é conhecido como potencializador da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos macrófagos. Foram ainda preparados dois brancos, um para cada tempo, contendo 100µl do meio de incubação, sem a adição de PMA. Cada grupo foi então analisado com e sem a presença de PMA. As placas de cultivo foram levadas a estufa a 37°C.

Para que fosse possível medir a variação da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proporcional ao tempo de incubação, primeiramente foram retirados os 100µl do poço branco 1 e de todos os poços referentes ao experimento de 60 minutos, sendo transferidos para outra placa contendo 10µl de solução aquosa de NaOH 1N em cada poço correspondente. Logo após a retirada do meio de incubação, a placa foi recolocada na estufa a 37°C, onde permaneceu por mais trinta minutos.

A oxidação do vermelho de fenol foi quantificada através de leitura da absorbância em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 620 nm. Os resultados foram obtidos em densidade óptica e estão apresentados em nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /10<sup>6</sup> células.

Para a obtenção de um padrão, foi feita uma curva de concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando peroxidase (HRPO tipo VI-A, 1310U/ml – Sigma) com a concentração final de 15U/ml.

Foram feitas três soluções de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas diluições 1:10, 1:100 e 1:1000. A concentração dessas soluções foi determinada através de sua absorbância em 240 nm, sendo o resultado utilizado em um coeficiente de 39,58 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Diluições apropriadas da solução estoque foram usadas para a determinação da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzida pelos macrófagos em cultura, segundo o método de Pick e Keisari, 1980. A absorbância dessas diluições foi lida em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 620 nm e o resultado foi utilizado para confeccionar a curva padrão.

#### 4.7. Detecção de anion superóxido ( $O_2^-$ )

A coleta do lavado foi realizada como descrito acima (item 4.4) e foram realizados os dois tipos de tratamento. O lavado foi distribuído com o auxílio de uma micropipeta em placas de cultivo de 96 poços. Foram utilizados  $5 \times 10^5$  macrófagos por poço que foram incubados por quinze minutos a  $37^\circ\text{C}$  5% de  $\text{CO}_2$  para a adesão nas placas. Para os experimentos *in vitro*, após esse tempo, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado meio de cultura “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal contendo penicilina 1 U/ml, estreptomicina 1  $\mu\text{g/ml}$ , e anfotericina 2,5  $\mu\text{g/l}$ . O cultivo foi realizado em estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 horas após o devido tratamento. Para os experimentos *in vivo*, após os 15 minutos de aderência, as células foram processadas segundo cada protocolo específico. Foram realizados 3 experimentos em triplicata para cada tratamento.

A produção de  $O_2^-$  foi quantificada pelo método baseado na redução extracelular do citocromo c, segundo o método de Sasada, Pabst e Johnston, 1983 (anexo 5). Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com “Hank’s Buffer Salt Solution” (HBSS) a  $37^\circ\text{C}$ . Foram adicionados 100 $\mu\text{l}$  de meio de incubação contendo citocromo c 80 $\mu\text{M}$  dissolvidos em HBSS em todos os poços. Posteriormente, em determinados poços foi ainda adicionado PMA na concentração de 1ng/ml. O PMA foi utilizado como controle positivo, uma vez que é conhecido como potencializador da produção de  $O_2^-$  pelos macrófagos. Foram ainda preparados brancos para cada tempo, contendo 100 $\mu\text{l}$  do meio de incubação, sem a adição de PMA. Cada grupo foi então analisado com e sem a presença de PMA. As placas de cultivo foram levadas a estufa a  $37^\circ\text{C}$ .

Para que fosse possível medir a variação da produção de  $O_2^-$  proporcional ao tempo de incubação, foi realizada uma curva de concentração (2, 4, 6, 15 e 30 minutos). Primeiramente foram retirados os 100 $\mu\text{l}$  do poço branco 1 e de todos os poços referentes ao experimento de 2 minutos, sendo transferidos para outra placa. Logo após a retirada do meio de incubação, a placa foi recolocada na estufa a  $37^\circ\text{C}$ , onde permaneceu pelos tempos testados.

A redução do citocromo c foi quantificada através de leitura da absorbância em leitor de microplacas (BIORAD) utilizando filtro de comprimento de onda de 550 nm. A quantidade de citocromo c reduzido, correspondente à quantidade de  $O_2^-$  liberado, foi calculada usando um coeficiente de extinção molar diferencial de 21.000  $M^{-1} cm^{-1}$  e estão apresentados em nmoles de  $O_2^-/10^6$  células.

#### 4.8. Detecção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO de macrófagos tratados com Canova foi medida por Godoy, 2002. Porém faltavam os resultados com controle positivo. Esse experimento foi então repetido, porém agora com o controle positivo e com 48 horas de cultivo.

A coleta do lavado foi realizada como descrito no item 4.4. e foram realizados os dois tipos de tratamento. Foram realizados 3 experimentos em triplicata para cada tratamento. O plaqueamento foi realizado em placas de cultura de 96 poços. Foram utilizados  $5 \times 10^5$  macrófagos por poço que foram incubados por quinze minutos a 37°C 5% de  $CO_2$  para a adesão nas placas. Para o tratamento *in vitro*, foi adicionado DMEM, as células foram divididas e tratadas conforme o grupo e foram incubadas por 48h em estufa 37°C 5% $CO_2$ . Para o tratamento *in vivo* as células foram cultivadas por 48h sem adição do medicamento.

A avaliação da produção de óxido nítrico foi determinada após 48 horas de cultivo, indiretamente a partir da determinação da concentração de nitrito ( $NO_2^-$ ), o qual é um produto estável da reação de produção de NO, no sobrenadante das culturas (anexo 6). Alíquotas de 100 $\mu$ l de cada sobrenadante foram transferidas para placas de 96 poços e misturadas em igual proporção com o reagente de Griess\* que, na presença de nitrito, reage para produzir uma cor lilás. A densidade óptica (D.O.) de cada amostra foi então determinada em leitor de microplacas (BIORAD) em 550nm.

A concentração de nitrito presente no sobrenadante das amostras foi calculada com base nos valores de D.O. obtidos para cada concentração (10 $\mu$ M-80 $\mu$ M) de uma curva padrão, confeccionada com a utilização de uma solução de nitrito de sódio diluído em meio de cultura, em concentração conhecida.

\*(Naftiletilenodiamino 0,1% em ácido fosfórico 5% e Sulfonamina p-aminobenzeno 1% em ácido fosfórico 5% na proporção de 1:1)



#### 4.9. Imunomarcação para óxido nítrico sintase induzível (iNOS)

A partir das células tratadas *in vivo* e *in vitro* foi realizada a detecção da enzima iNOS (anexo 7). As células foram fixadas com glutaraldeído 0,05% e paraformaldeído 2% em PBS. As células foram então incubadas com cloreto de amônio 50nM em PBS. Aproximadamente  $2 \times 10^7$  células foram incubadas com 1 $\mu$ l de anticorpo anti iNOS (Sigma) de camundongo, diluído 1:100 em Triton-X/PBS 0,01%, durante 1 hora a temperatura ambiente. As células foram então lavadas em PBS e incubadas com Proteína A – gold 10 nm (Sigma) em Triton-X/PBS 0,01%, durante 30 minutos a temperatura ambiente. As células foram refixadas em glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em PBS por 30 minutos, processadas para MET, contrastadas e observadas no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 EXII, do CME da UFPR, da mesma forma como descrito para a citoquímica ultraestrutural para NAD(P)H oxidase (item 4.5).

#### 4.10. Análise estatística

A análise estatística foi realizada a partir da análise de variância (ANOVA: fator único) dos valores obtidos. O ANOVA foi realizado para garantir se havia ou não homogeneidade entre os dados. Foi utilizado também o teste de Tukey. Esse teste é realizado visando encontrar a diferença mínima entre as médias para que exista diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Para isso, foi aplicada a seguinte fórmula:

$$To = q \sqrt{QME / R}$$

Onde q é o valor encontrado na tabela de valores da amplitude total estudentizada (q) para  $\alpha = 5\%$ , segundo o número de tratamento (k) e os graus de liberdade do resíduo (grau de liberdade do erro); QME é o MQ do erro, e R é o número de repetições (VIEIRA, 1980).

#### 4.11. Laranja de acridina

Para microscopia confocal os macrófagos foram tratados *in vitro* e *in vivo*, e após, incubados com solução de laranja de acridina 5 µg/ml, durante 20 minutos a 37°C 5% CO<sub>2</sub> (anexo 11). As lamínulas foram colocadas sobre uma gota de PBS estéril na lâmina. Logo após foram observadas em microscópio confocal (BIORAD) utilizando laser de Argônio (488nm).

#### 4.12. Detecção de CD 74 (Ii) em citometria de fluxo

Para verificar a expressão do CD 74 (cadeia invariante do MHC de classe II) foram utilizadas células tratadas *in vivo*. As células foram processadas segundo protocolo (anexo 12). As células foram fixadas e permeabilizadas com BD Cytofix/Cytoperm kit (BD Bioscience), incubadas com anticorpo monoclonal anti CD74 (Ii) conjugado com FITC (BD Bioscience) – 0,5 µg/10<sup>6</sup> células – por 40 minutos a temperatura ambiente e no escuro, foram lavadas e observadas em citômetro de fluxo (FACScalibur). Os dados obtidos no citômetro foram analisados estatisticamente através de ANOVA e Tukey, como descrito no item 4.10.

#### 4.13. Detecção de CD 74 (Ii) em MET

A partir das células tratadas *in vivo* e *in vitro* foi realizada a detecção do CD 74 (anexo 13). As células foram fixadas e permeabilizadas com BD Cytofix/Cytoperm kit (BD Bioscience), lavadas e incubadas com anticorpo monoclonal anti CD74 (Ii) purificado (BD Bioscience) – 0,5 µg/10<sup>6</sup> células – por 30 minutos a temperatura ambiente. Novamente as células foram lavadas e incubadas com proteína A – gold 10nm (Sigma), também por 30 minutos. Em seguida as células foram processadas para MET, contrastadas e observadas no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 EXII, do CME da UFPR, da mesma forma como descrito para a citoquímica ultraestrutural para NAD(P)H oxidase (item 4.5).

#### 4.14. Mensuração de citocinas no sobrenadante

O procedimento para a análise de citocinas produzidas pelos macrófagos e liberadas no sobrenadante da cultura, foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante do kit – “Mouse Th1/Th2 cytokine CBA” – BD Pharmingen (anexo 14). A partir desse kit são detectadas as seguintes citocinas: interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ).

Após 48 horas de cultivo em placa de 96 poços ( $5 \times 10^5$  células/poço) ou 15 minutos de adesão das células tratadas *in vivo*, foi retirado o sobrenadante celular e centrifugado para retirar qualquer célula presente. O sobrenadante foi incubado com os “beads” de captura do kit e com os anticorpos contra as citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-5 IL-4, IL-2 (“mouse Th1/Th2 PE detection reagent”) conjugados com o ficoeritrina (PE) por 2 horas no escuro. Foi adicionado a cada tubo do experimento 100 $\mu$ l da solução de lavagem e leitura (“washing buffer”) e centrifugado a 1.300 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado mais 200 $\mu$ l de “washing buffer”. A solução resultante foi homogeneizada e analisada imediatamente em citômetro de fluxo (FACSCalibur).

#### 4.15. Expressão gênica

Para esse experimento os camundongos foram tratados *in vivo* e os macrófagos foram coletados segundo o item 4.4., porém “RNase free”. Isso pôde ser obtido através de limpeza com álcool 70% ou com uma solução de água e dietilpirocarbonato (DEPC) 1:1000 (desde a bancada, luvas, pipetas, tubos até reagentes utilizados deviam ser “RNase free”).

Após a coleta das células dos animais tratados, os RNAs foram extraídos das células dos vários grupos através de um kit da marca Qiagen (RNeasy mini kit). Foram seguidas as recomendações e os protocolos fornecidos pelo fabricante do kit (anexo 15). Foram utilizadas  $1 \times 10^7$  células por grupo. Foram realizados três experimentos independentes. Uma vez que os RNAs estavam eluídos em água DEPC, foi medido o volume final de cada grupo com o auxílio de micropipeta. Foi calculada a concentração total de RNA nesse volume (anexo 16 e 17). Os RNAs

foram então mandados para os Estados Unidos, onde a partir dos RNAs obtido dos diversos grupos, foram sintetizados cDNAs e então cRNAs. Os RNAs foram hibridizados em GeneChips<sup>®</sup> MG74Av2 (Affymetrix). A hibridização foi realizada seguindo as instruções do fabricante do chip. O chip foi lavado em estação fluídica (GeneChip<sup>®</sup> Fluidics Station 400) e escaneado em Scanner GeneArray<sup>®</sup> (Affymetrix) equipado com laser de argônio. A captura e análise inicial das imagens da hibridização foram realizadas com o auxílio do software MicroArray Suite 5.0 – MAS (Affymetrix). Ao final desse processo foi criado um arquivo tipo CEL, contendo os valores de intensidade de cada “probe” presente no GeneChip<sup>®</sup>. Os dados obtidos dos três experimentos independentes foram analisados estatisticamente no Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) através do método de RMA (“Robust Multi-Array method” - Irizarry et al., 2003). A determinação da expressão diferencial foi realizada utilizando o método de SAM (“Significance Analysis of Microarray” - Tusher, Tibshirani e Chu, 2001). Os critérios para a seleção dos genes diferencialmente expressos (DEGs) foram de possuir “fold change” de no mínimo 2 vezes e taxa de falsa seleção (FDR – “false discovery rate”) de 5%. Ou seja, o gene selecionado devia ter no mínimo aumentado ou diminuído em 2 vezes a sua expressão, e dentre os genes selecionados, no máximo 5% poderiam ter sido erroneamente selecionados.

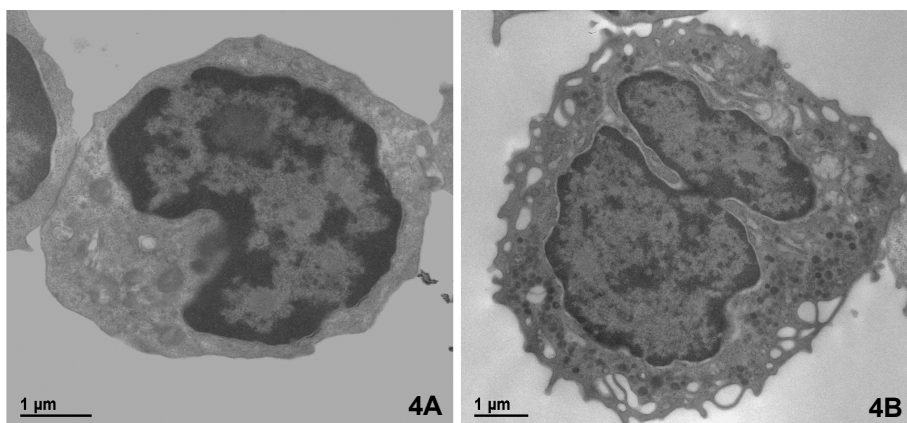
#### **4.16. Imunofenotipagem**

Sabe-se que a grande maioria das células encontradas no peritônio de camundongos são macrófagos. A fim de se ter um controle maior dos experimentos de expressão gênica, foi realizada a imunofenotipagem das células peritoneais de camundongos, tratados ou não com CA (anexo 18). As células, após o tratamento *in vivo*, foram coletadas, lavadas com PBS e incubadas com anticorpo monoclonal anti CD45, CD11b e CD3 conjugados com PE (0,5 µg/10<sup>6</sup> células), por 40 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Em seguida, as células foram lavadas e observadas em citômetro de fluxo (FACScalibur).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os M $\phi$  possuem papel essencial na defesa do organismo contra agentes infecciosos e células tumorais. Vários trabalhos mostram que, para exercer corretamente a função de defesa, os M $\phi$  devem ser ativados. Estudos recentes com o medicamento CA descreveram sua atividade em macrófagos. Aproximadamente 86% dos M $\phi$  tratados com CA possuem morfologia de células ativadas em microscopia de luz, eletrônica de transmissão e eletrônica de varredura (Piemonte e Buchi, 2002). Os nossos resultados agora encontrados para esses experimentos, realizados *in vitro* ou *in vivo*, foram semelhantes. Os procedimentos para realização de todos os experimentos estão listados em anexo. Foram utilizados 3 grupos : Canova (CA), solução hidro-alcoólica sucussionada (Hs) e controle ou normal (N).

A maioria das células dos grupos controle apresentava morfologia de residente, ou seja, núcleo pequeno, escuro, oval ou reniforme, citoplasma pouco vacuolizado e poucos grânulos citoplasmáticos densos (Fig. 4A), com poucas células ativadas. O grupo CA por sua vez, apresentou M $\phi$  ativados (Fig. 4B) definidos por alterações morfológicas, como descrito por Piemonte e Buchi em 2002. M $\phi$  ativados são maiores, com núcleo grande, lobulado, claro com muita eucromatina e nucléolo evidente, citoplasma bastante claro e vacuolizado, apresentando várias projeções citoplasmáticas.



**FIGURA 4 – MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS.** **Fig. 4A** - M $\phi$  residente encontrado nos grupos controles, observado em microscopia eletrônica de transmissão (MET). **Fig. 4B** - M $\phi$  ativado encontrado no grupo CA também observado em MET. Eletronmicrografias provenientes de três experimentos independentes em triplicata.

### 5.1. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS)

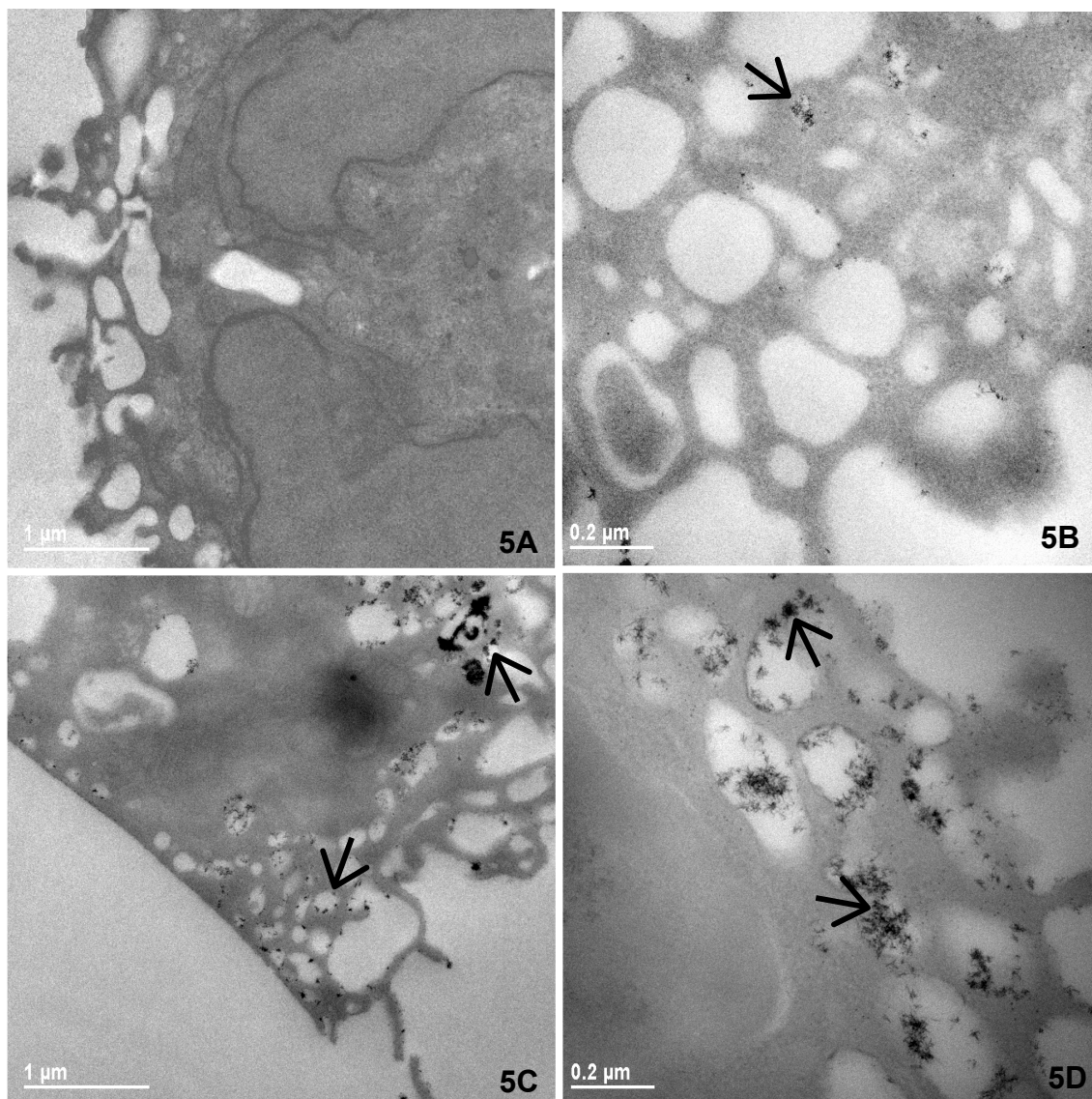
A capacidade de resposta aumentada em M $\phi$  ativados é resultado, em parte, da aumentada capacidade dessas células em produzir determinadas moléculas. Quando estimulados por vários tipos de agentes, os M $\phi$  produzem e liberam ROS e grandes quantidades de óxido nítrico (Forman e Torres, 2001). Esses oxidantes são gerados pelas enzimas NAD(P)H oxidase e iNOS respectivamente (Babior, 2000). Nesse trabalho foi investigado *in vivo* e *in vitro* a atividade das enzimas NADPH oxidase e iNOS, bem como a produção de O $_2^-$ , H $_2$ O $_2$  e NO por macrófagos peritoneais de camundongos.

Durante a ativação dos M $\phi$  ocorre o chamado “burst oxidativo” (Pick e Keisari, 1980) onde o consumo de oxigênio molecular (O $_2$ ) pela célula aumenta. Ocorre a produção de NAD(P)H, outros intermediários redutores são ativados e vários produtos de oxigênio são produzidos. Nesse caminho encontra-se em atividade uma enzima multicomponente, a NAD(P)H oxidase (Wood e Austyn, 1993). NAD(P)H oxidase é uma cadeia transportadora de elétrons que usa NAD(P)H como doador de elétrons para reduzir O $_2$  em O $_2^-$  (Segal e Abo, 1993). O O $_2^-$  é convertido a H $_2$ O $_2$  espontaneamente ou pela ação da superóxido desmutase (SOD) (Pick e Keisari, 1980). Assim, a aumentada capacidade de M $\phi$  peritoneais de camundongo ativados secretarem ROS deve-se ao aumento da afinidade de sua oxidase por NAD(P)H (Tsunawaki e Nathan, 1984). A NAD(P)H oxidase encontra-se normalmente dormente em M $\phi$  residentes, porém ela pode ser rapidamente ativada após estímulos. Quando a célula é ativada, as subunidades citosólicas migram para as membranas onde se ligam às subunidades associadas às membranas formando a oxidase ativa. Esse processo resulta na produção de ROS intracelularmente em vesículas e liberadas extracelularmente (Babior, 2000).

A detecção da atividade da NAD(P)H oxidase foi observada através de citoquímica ultraestrutural, observada em MET. Essa técnica é baseada na reação do H $_2$ O $_2$  gerado com o cloreto de cério, resultando em um precipitado de peridróxido de cério (Ce-[OH] $_2$ OOH) (Briggs et al., 1975). A observação dos cortes das células processadas para a detecção da enzima NAD(P)H oxidase, permitiu a identificação dos grupos experimentais. Os M $\phi$  foram observados sem contrastação para garantir

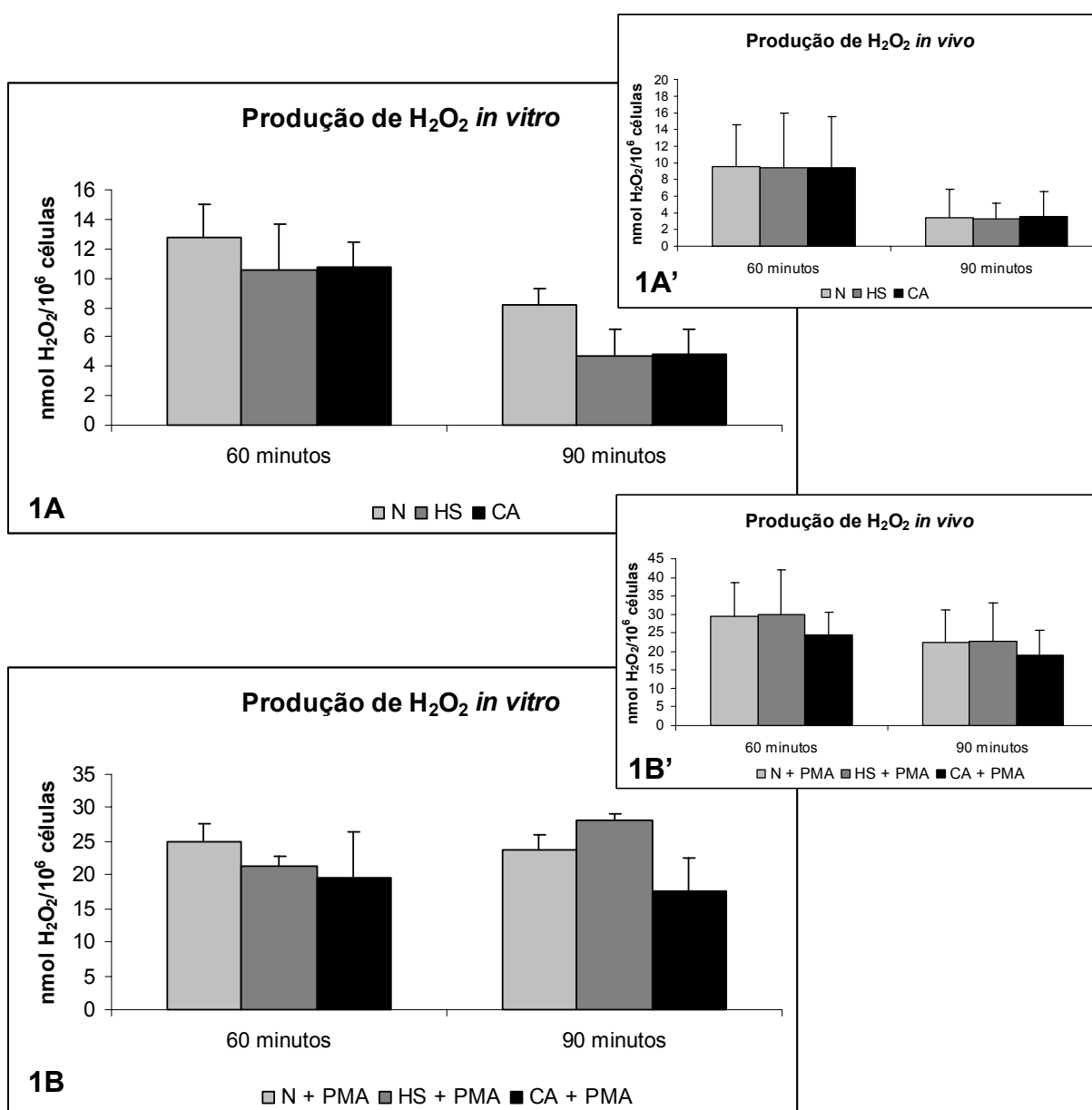
que os produtos eletrondensos fossem indicativos positivos da atividade enzimática. Foi observada marcação positiva (precipitado de cério) para a enzima NAD(P)H oxidase tanto no grupo controle quanto no grupo tratado dos experimentos *in vitro* (Oliveira, 2002) e *in vivo*.

O produto da enzima foi observada tanto na membrana plasmática quanto em estruturas semelhantes a vesículas ou cortes de invaginações das células. Quando o substrato da enzima foi omitido do meio de incubação (grupo controle da enzima), não foi observado produto de reação em nenhum grupo testado (Fig. 5A). A geração de produto de reação é fortemente dependente da presença de NAD(P)H exógeno, sendo claramente uma reação específica. Depósitos ocasionais de precipitado foram detectados no grupo controle. Quando encontrados, localizavam-se em vesículas e na superfície externa da membrana plasmática dos poucos M $\phi$  ativados encontrados nesse grupo (Fig. 5B). Porém, a marcação observada nesse grupo não foi tão intensa quanto no grupo tratado. No grupo tratado a maioria das células apresentou intensa marcação eletrondensa positiva, sugerindo uma maior atividade da enzima NAD(P)H oxidase neste grupo. Depósitos do produto da reação foram encontrados principalmente dentro de vesículas (Fig. 5C e 5D). Através dessa técnica não foi encontrado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em nenhuma organela como, por exemplo, mitocôndrias. Na superfície externa da membrana plasmática também foi encontrado material eletrondenso, porém em quantidades semelhantes aos M $\phi$  do grupo controle. Esse dado foi confirmado através da detecção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no sobrenadante dos M $\phi$ , o qual mostrou que, estatisticamente, não havia diferença entre a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos M $\phi$  controle e tratado (Graf. 1A). Mesmo fazendo-se uma comparação somente entre os grupos com PMA (controle positivo), não foi encontrada diferença significativa (Graf. 1B). Quando foram comparados os grupos testados com os controles positivos foi encontrada diferença significativa. O resultado da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> baseia-se na oxidação, dependente de peroxidase, do vermelho de fenol pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> descrita por Pick e Mizel em 1981. Esses dados foram obtidos a partir do tratamento *in vitro* sendo semelhantes aos obtidos com o tratamento de células *in vivo* – Graf. 1A' e 1B' (Oliveira, 2002).



**FIGURA 5 – CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL PARA NAD(P)H OXIDASE.** Os Mφ provenientes de tratamento *in vitro* e *in vivo* foram incubados com o substrato da enzima (NAD(P)H) e com cloreto de cério. Após a incubação, foram fixados e processados para MET. Essas células foram observadas sem contrastação para garantir que os precipitados eletrondensos eram provenientes da atividade enzimática. **Fig. 5A** – ausência de produto de reação no grupo controle da enzima, confirmando a especificidade da reação. **Fig. 5B** – célula do grupo controle mostrando reação positiva (muitas vesículas sem precipitado). **Fig. 5C e 5D** – células do grupo tratado mostrando intensa marcação, principalmente dentro de vesículas. Flecha – produto da reação representativo da atividade da NAD(P)H oxidase. Eletronmicrografias provenientes de três experimentos independentes em triplicata.



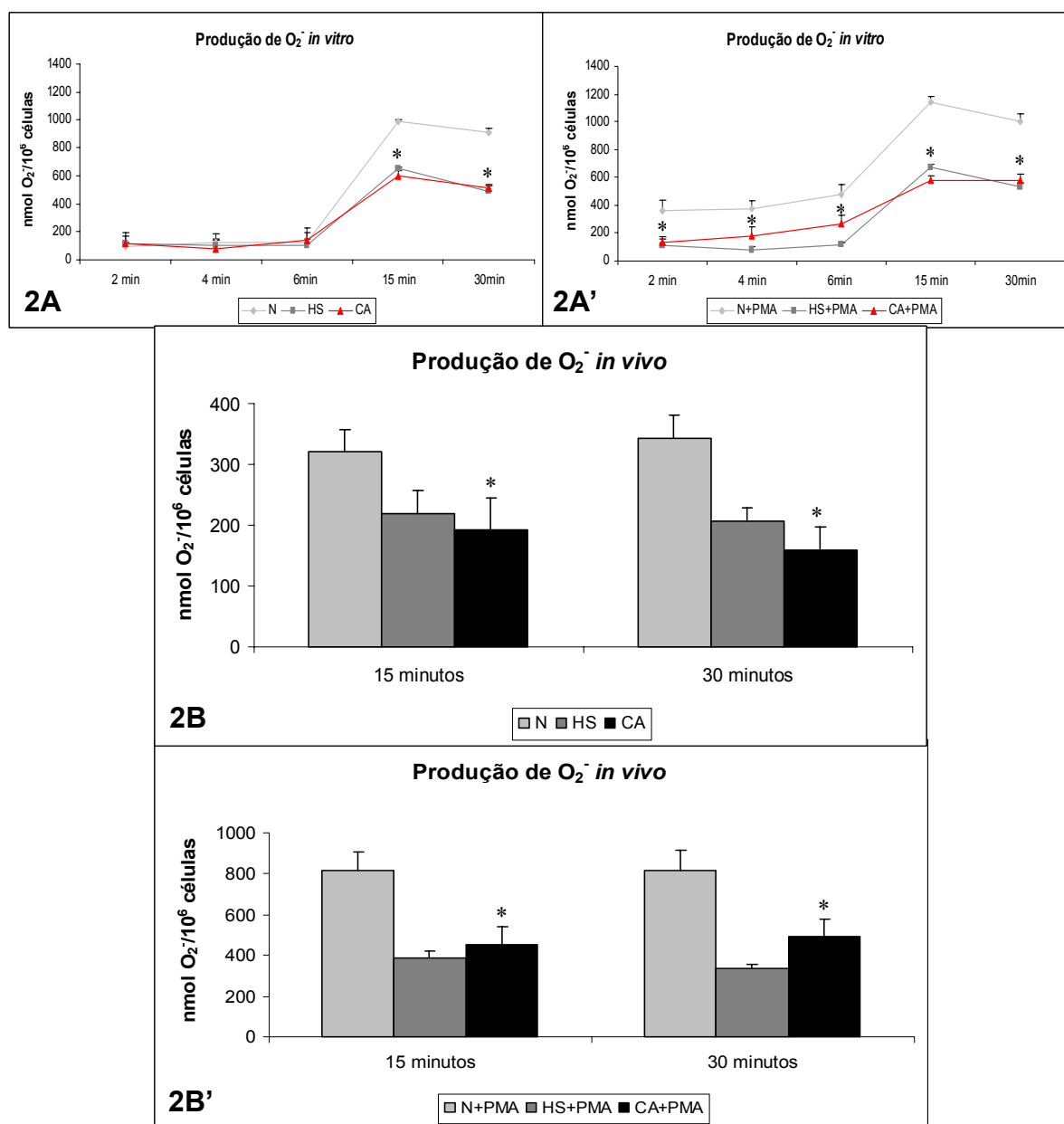


**GRÁFICO 1 – PRODUÇÃO DE  $H_2O_2$ .** Os M $\phi$  provenientes de tratamento *in vitro* e *in vivo* foram incubados com solução de vermelho de fenol e peroxidase. PMA foi utilizado como indutor da produção de  $H_2O_2$ . A quantidade de  $H_2O_2$  produzido foi quantificada no sobrenadante da cultura. Esse foi lido em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 620nm. **Graf. 1A** – produção de  $H_2O_2$ , em 60 e 90 minutos, por M $\phi$  tratados ou não com CA *in vitro*. **Graf. 1B** – produção de  $H_2O_2$ , em 60 e 90 minutos, por M $\phi$  tratados ou não com CA *in vitro* adicionados de PMA (indutor da produção de  $H_2O_2$ ). **Graf. 1A' e 1B'** – comparação com resultados prévios (Oliveira, 2002). Média + desvio padrão relativos a três experimentos independentes em triplicata, analisados com ANOVA e teste de Tukey.

A maior fonte de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas células é gerada a partir da conversão espontânea de  $\text{O}_2^-$  ou via ação da enzima SOD, que cataliza a formação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a partir do  $\text{O}_2^-$  (Jones, Hancock e Morice, 2000). A atividade da enzima NAD(P)H oxidase é a maior fonte de produção de  $\text{O}_2^-$  em M $\phi$ , porém outras vias também podem gerar esse radical, como por exemplo, através da iNOS. A produção de  $\text{O}_2^-$  por M $\phi$  é crítica para a defesa do organismo. A natureza citotóxica do  $\text{O}_2^-$  e das moléculas provenientes das suas interações contribuem não somente para a morte de organismos invasores, como também no dano tecidual e na inflamação (Xia e Zweier, 1997).

Quando  $\text{O}_2^-$  é produzido e liberado da célula, o método mais confiável para sua mensuração é o da redução do citocromo c (Forman e Torres, 2001). A detecção de  $\text{O}_2^-$  no sobrenadante da cultura foi realizada em M $\phi$  tratados *in vitro* e M $\phi$  de camundongos tratados *in vivo*, segundo método descrito por Johnston, Godzik e Cohn em 1978. Foi realizada uma curva de tempo visando monitorar temporalmente esse radical. Um intervalo entre 5 e 30 minutos foi utilizado no experimento *in vitro* (Graf. 2A e 2A'). Foi observada uma produção crescente desse anion até cerca de 15 minutos. A partir desse ponto a concentração começou a diminuir. Quando comparada estatisticamente, os grupos controle e Canova, a diminuição após 15 minutos foi significativa. Após a estimulação com PMA, a concentração de  $\text{O}_2^-$  produzido pelos M $\phi$  tratados com CA foi menor em todos os tempos testados provavelmente pela interação com outros radicais produzidos. Para o tratamento *in vivo* foram testados apenas os tempos de 15 e 30 minutos. Os resultados foram semelhantes aos do tratamento *in vitro*, onde o grupo tratado apresentou diminuição na produção de  $\text{O}_2^-$  (Graf. 2B e 2B').

O estado de aumento moderado dos níveis intracelulares de ROS é conhecido como estresse oxidativo (Alonso-Magdalena et al., 2003). O papel das ROS produzidas pelo “burst oxidativo” tem sido implicado na defesa do organismo (Nygren et al., 2001), e como segundos mensageiros nas vias de sinalização de M $\phi$ . A produção das ROS pode ser induzida por vários estímulos em M $\phi$ . Sendo assim essas espécies reativas podem modular a função dos M $\phi$  durante uma grande variedade de respostas fisiológicas (Forman e Torres, 2001) como, por exemplo, a modulação dos níveis de antioxidantes, a indução da expressão de novos genes e a modificação de proteínas (Li e Karin, 1999).



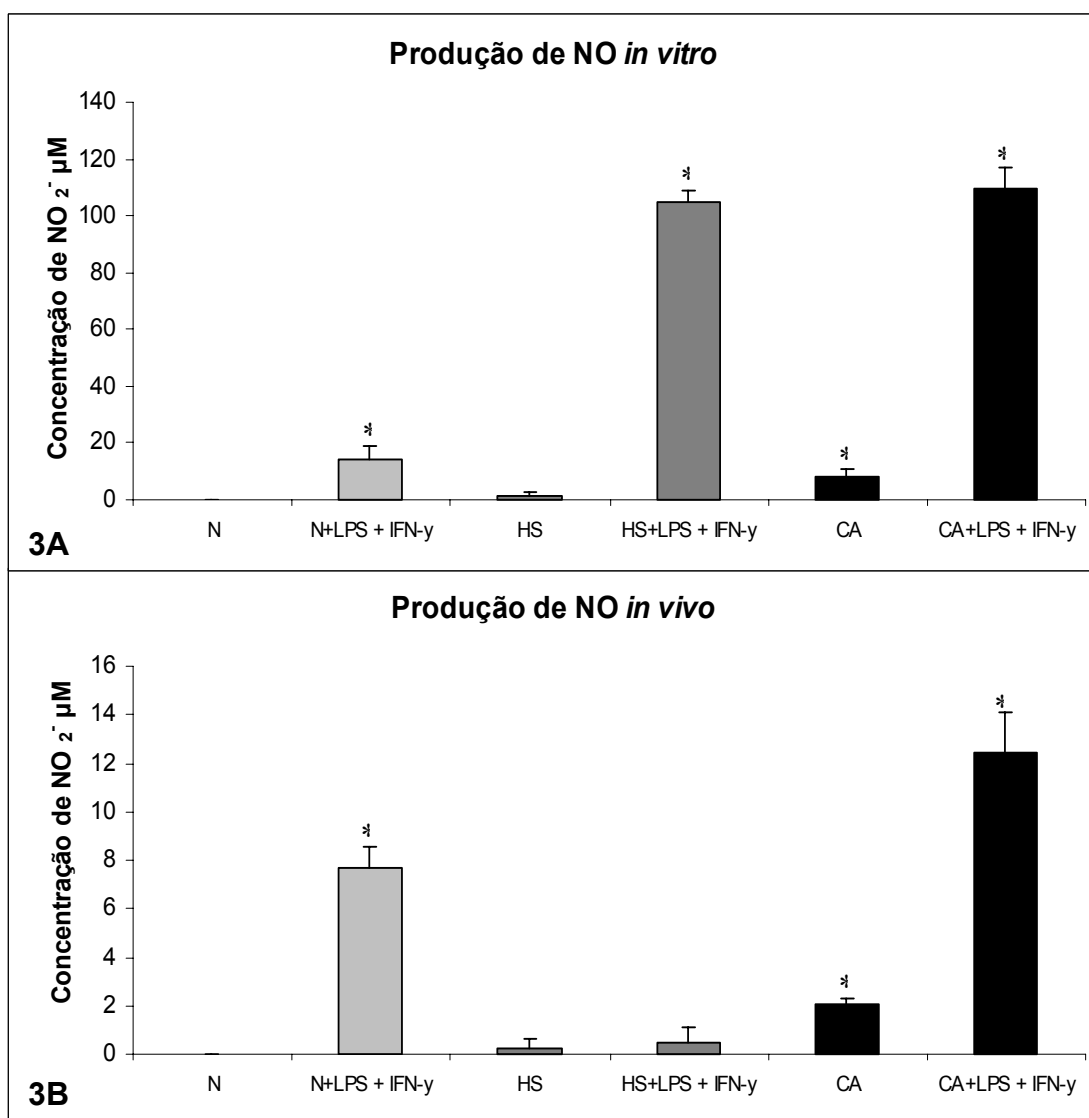
**GRÁFICO 2 – PRODUÇÃO DE  $O_2^-$ .** Após tratamento *in vitro* e *in vivo* os M $\phi$  foram incubados com solução contendo citocromo c. A mensuração da redução do ferricitocromo c pelo  $O_2^-$  foi obtida através de leitura do sobrenadante da cultura em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 550nm. **Graf. 2A e 2A'** – curva de tempo produção de  $O_2^-$  por M $\phi$  tratados ou não com CA *in vitro*. **Graf. 2B e 2B'** – produção de  $O_2^-$  em 15 e 30 minutos, por M $\phi$  tratados ou não com CA *in vivo*. **Graf. 2A' e 2B'** – controle positivo com PMA (indutor da produção de  $O_2^-$ ). Média + desvio padrão relativos a três experimentos independentes em triplicata, analisados com ANOVA e teste de Tukey \*P < 0,05.

O óxido nítrico é um mensageiro molecular produzido na oxidação da L-arginina por uma família de enzimas chamadas óxido nítrico sintases (NOS) (Rawlingson, 2003). É um produto citotóxico produzido por Mφ ativados e, junto com ROS, tem sido implicado em várias funções regulatórias (Wink e Mitchell, 1998). Uma delas é a ação direta sobre parasitas, causando efeitos tóxicos e inibitórios em vários processos celulares como crescimento e multiplicação. A capacidade de inibir a produção de NO tem sido demonstrada por vários parasitas intracelulares como *Leishmania* sp (Liew, Wei e Proudfoot, 1997), *Toxoplasma gondii* (Seabra, de Souza e Damatta, 2002) e *Trypanosoma cruzi* (Pakianathan e Kuhn, 1994). O NO e as ROS são produzidos sob uma grande variedade de condições biológicas e são críticos na defesa do organismo não só por danificarem patógenos e células tumorais, mas também por serem reguladores do sistema imunitário (Nathan e Shiloh, 2000; Han et al., 2001).

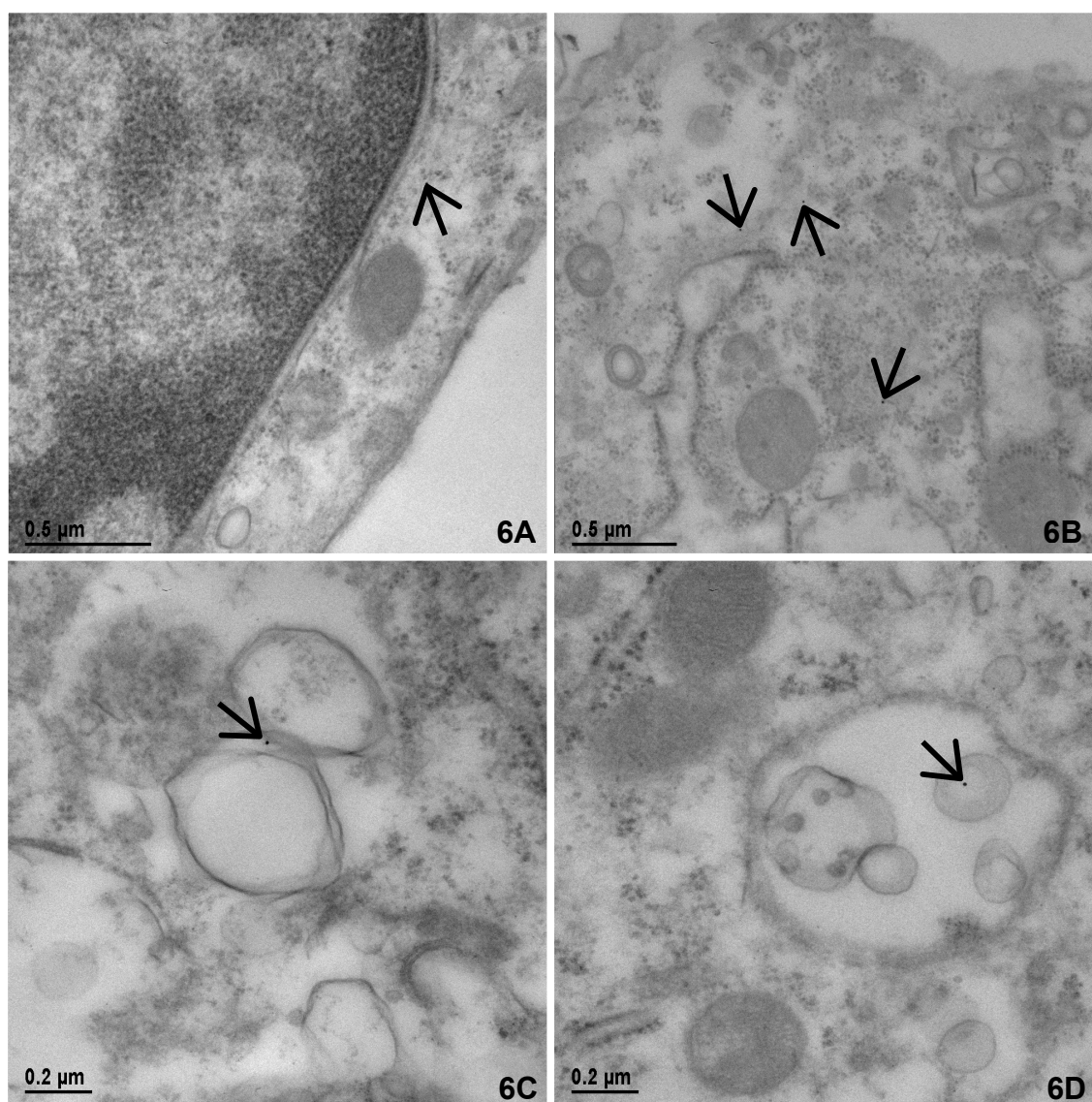
Experimentos em nosso laboratório mostraram um aumento estatisticamente significativo na produção de NO pelos Mφ tratados com CA (Godoy, 2002). Como nesses experimentos estavam faltando os resultados com o controle positivo eles foram repetidos.

A avaliação da produção de NO foi determinada após 48 horas de cultivo, ou em Mφ de camundongos tratados *in vivo*, indiretamente a partir da determinação da concentração de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), o qual é um produto estável da reação de produção de NO, no sobrenadante das culturas (Green et al., 1982). Os resultados encontrados foram semelhantes, ou seja, um aumento na produção de NO por macrófagos tratados com Canova. Os resultados obtidos no controle positivo tratado com CA são cumulativos com o CA, ou seja, o aumento da produção de NO pelo LPS e IFN $\gamma$  somou-se o efeito do Canova (Graf. 3A e 3B).

Verificou-se que o aumento da produção de NO encontrada no grupo tratado com CA, foi acompanhada pelo aumento da detecção da enzima iNOS, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A enzima foi marcada através de anticorpo contra iNOS e proteína A conjugada com ouro coloidal 10nm e observada em MET. A enzima foi encontrada no citoplasma, localizada principalmente próxima a vesículas e mitocôndrias (Fig. 6B, C e D).



**GRÁFICO 3 – PRODUÇÃO DE NO.** Após tratamento *in vitro* e *in vivo* o sobrenadante dos Mφ foi incubado com o reagente de Griess. O LPS e IFN-γ foram utilizados como indutores da produção de NO. A mensuração da quantidade de nitrito produzida foi obtida através de leitura em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 550nm. **Graf. 3A** – produção de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> por Mφ tratados ou não com CA *in vitro*. **Graf. 3B** – produção de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> por Mφ tratados ou não com CA *in vivo*. Média + desvio padrão relativos a três experimentos independentes em triplicata, analisados com ANOVA e teste de Tukey \*P < 0,05.



**FIGURA 6** – IMUNOMARCAÇÃO PARA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL (iNOS). Os Mφ provenientes de tratamento *in vitro* e *in vivo* foram incubados com anticorpo anti iNOS e proteína A complexada com ouro coloidal 10nm. Após a incubação, foram fixados e processados para MET. Figuras referentes à Mφ tratados com CA. **Fig. 6A** – Detecção da iNOS próxima ao núcleo, **Fig. 6B** – próxima à mitocôndria, e **Fig. 6C and 6D** – dentro de vesículas. Flechas apontando para ouro 10nm representando a localização da iNOS. Eletronmicrografias provenientes de três experimentos independentes em triplicata.

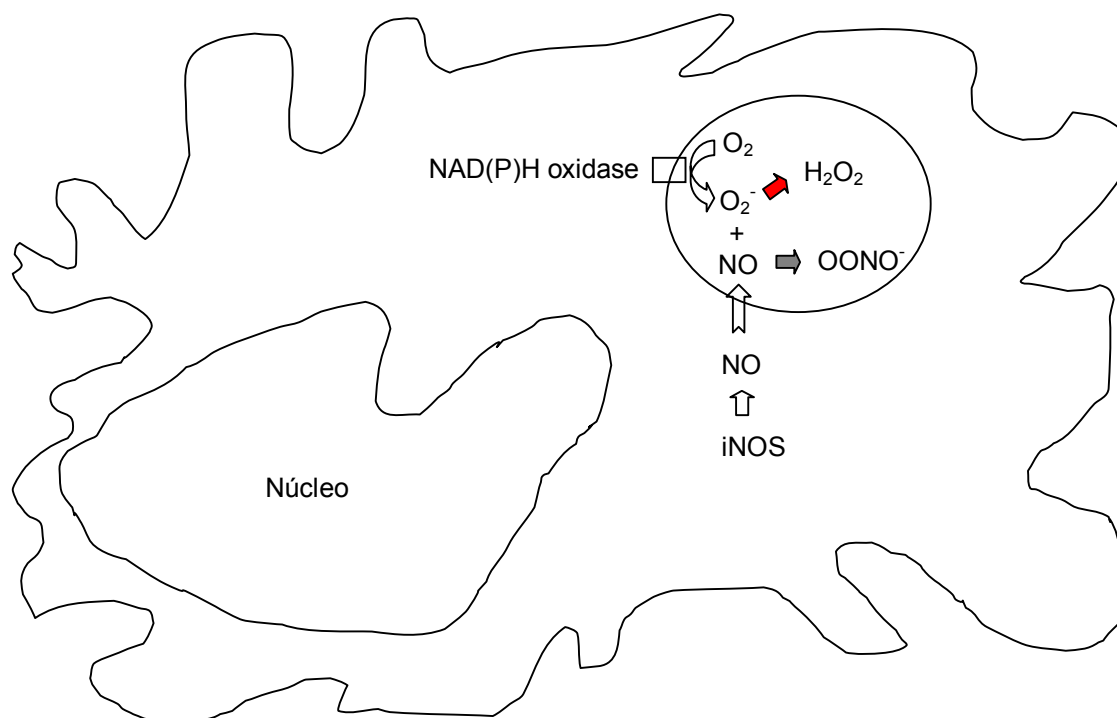
Com esses experimentos demonstrou-se que M $\phi$  tratados com CA apresentaram aumento da atividade da enzima NAD(P)H oxidase assim como a iNOS, produzindo conseqüentemente ROS e NO respectivamente. Os mecanismos envolvidos na fagocitose normalmente agem sinergisticamente. ROS são muito instáveis e são altamente reativos. Quando há um grande aumento na produção de NO, esse passa a estar envolvido no processo inflamatório, interagindo com várias substâncias (Murakami e Traber, 2003), como por exemplo os radicais de oxigênio, com os quais reage muito rapidamente (Darley-Usmar, Wiseman e Halliwell, 1995). As interações biológicas e químicas do NO e ROS com várias moléculas biológicas tem importantes conseqüências nos mecanismos de diferentes condições imunológicas e patológicas.

M $\phi$  produzem O $_2^-$  e NO em quantidades quase equimolares. Em células que produzem tanto O $_2^-$  quanto NO ocorre à reação, perto do limite de difusão ( $6,7 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), entre essas duas moléculas, resultando na formação do peroxinitrito (ONOO $^-$ ) (Forman e Torres, 2001). Assim, o local de ação do ONOO $^-$  deve ser nas proximidades das fontes de O $_2^-$  (Wink e Mitchell, 1998; Nathan e Shiloh, 2000). A superóxido desmutase (SOD) é conhecida como o sistema protetor antioxidante celular mais potente contra os efeitos do O $_2^-$ . Entretanto, sabe-se que sob condições onde a produção de NO está aumentada, o NO compete eficientemente com a SOD pelo O $_2^-$ , formando o ONOO $^-$  (Virag et al., 2003). O ONOO $^-$  é uma molécula oxidante extremamente potente que contribui para o dano celular, incluindo a peroxidação lipídica, nitrosilação de diferentes moléculas, interação com canais de sódio e interação com diferentes metais de transição (Forman e Torres, 2001).

A ativação da NAD(P)H oxidase levou ao aumento de produtos dentro de vesículas, como observado nas figuras 5C e 5D. A detecção da iNOS ocorreu próxima a locais contendo vesículas, como observado nas figuras 6C e 6D. Uma vez que o NO é uma molécula pequena e não carregada e pode atravessar a membrana vesicular (Rawlingson, 2003), pode-se presumir que em M $\phi$  tratados com CA está ocorrendo a formação de ONOO $^-$  dentro de vesículas. Esse fato pode ser correlacionado com a diminuição considerável da produção de O $_2^-$  em células tratadas, após 15 minutos (Graf. 2A e 2B). O citocromo c reduzido pode ser reoxidado por oxidantes como o ONOO $^-$ , aparentemente diminuindo as taxas de redução do citocromo c (Tarpey e Fridovich, 2001). Sendo assim, o fato de se

detectar maior atividade da NAD(P)H oxidase nas células tratadas, não implica necessariamente na detecção do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , uma vez que o  $\text{O}_2^-$  é uma molécula tóxica, instável e altamente reativa, que antes de ser dismutado em  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode se combinar com o NO, formando  $\text{ONOO}^-$  (Murphy et al., 1998). Provavelmente devido a essa interação os níveis de produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por  $\text{M}\phi$  tratados com o CA não estão aumentados em relação ao controle.

O  $\text{ONOO}^-$  é uma molécula de vida curta, muito mais reativa que seus precursores. Ele reage rapidamente com enzimas, macromoléculas e lipídios, influenciando várias funções celulares. A formação de  $\text{ONOO}^-$  a partir de  $\text{O}_2^-$  e NO pode ser muito útil em algumas situações. Fagócitos podem gerar  $\text{ONOO}^-$  para ajudar a destruir patógenos. E, em algumas circunstâncias, pode agir como defesa antioxidante prevenindo o aumento da concentração de  $\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Murphy et al., 1998; Linares et al., 2001; Szabó, 2003). Sendo assim, o medicamento CA provoca nos  $\text{M}\phi$  ativação celular, modificando a produção de moléculas reativas (Fig. 7), promovendo o aumento das defesas do organismo.



**FIGURA 7** – DESENHO ESQUEMÁTICO RESUMINDO OS EFEITOS DO CANOVA.

O CA aumentou a atividade da NAD(P)H oxidase e iNOS, aumentando conseqüentemente, seus produtos. O NO pode reagir com o  $\text{O}_2^-$  formando  $\text{ONOO}^-$ .

→ = formação; → = provável formação; → = inibição.



## 5.2. Laranja de acridina

Atividade metabólica alterada em células ativadas pode ser revelada através de técnicas de fluorescência. Normalmente células vivas em cultura são estudadas morfolologicamente através de microscopia de contraste de fase ou de interferência, pois estas proporcionam contraste suficiente do objeto de estudo. Porém essas técnicas não fornecem informações suficientes sobre o estado funcional das células e organelas. Entretanto, com a microscopia de fluorescência pode-se estudar os processos vitais de células e organelas (Söderström, 1977).

Observou-se uma grande quantidade de vesículas ácidas em M $\phi$  tratados com CA quando marcados por laranja de acridina. O laranja de acridina é um corante fluorescente utilizado para monitoração de mudanças citoplasmáticas associadas com ativação celular (Nairn e Rolland, 1980). Ele pode ser utilizado como coloração supravital de células, onde durante a exposição de células vivas a baixas concentrações de laranja de acridina, devido ao pH baixo dentro dos lisossomos, esse corante é preso nessas organelas, emitindo luminescência vermelha. Pode também ser usado para estimar a eficiência da bomba de próton dos lisossomos. Além disso, possibilita a coloração diferencial de RNA e DNA: laranja de acridina mostra uma considerável mudança na sua absorbância e emissão de espectro quando ligada a ácidos nucleicos de dupla fita, comparada à fita simples. A fluorescência é verde quando a laranja de acridina intercala com DNA, e vermelha, quando com RNA (Darzynkiewicz, 1994).

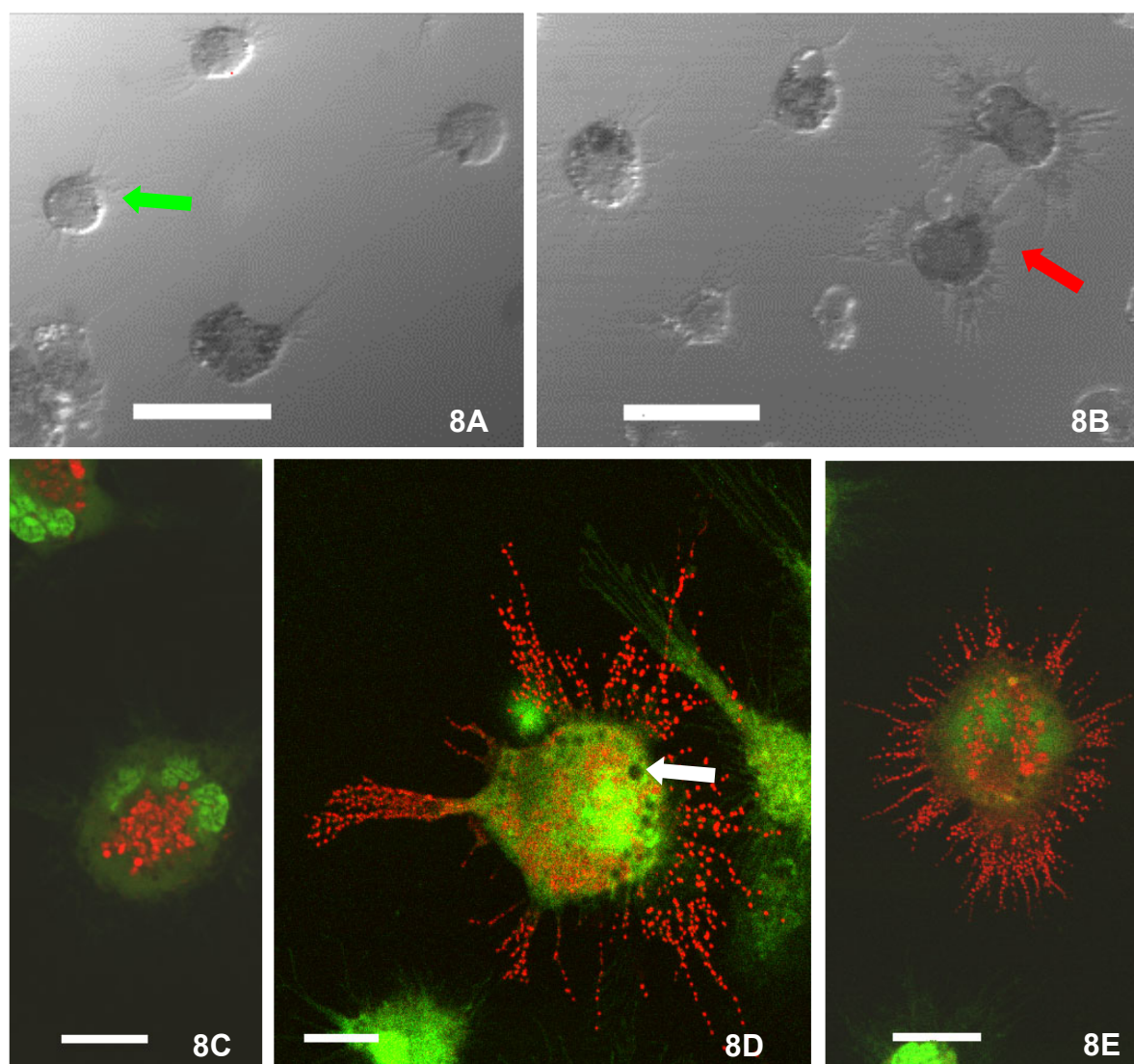
Foram observados M $\phi$  corados com laranja de acridina na concentração de 5  $\mu$ g/ml. Os M $\phi$  foram tratados *in vitro* e observados em microscópio confocal. A maioria das células dos grupos controle (N e HS) apresentou morfologia de células residentes, como esperado, quando observados em Contraste Diferencial de Interferência (DIC) (Fig. 8A). O grupo CA apresentou grande parte das células com morfologia de ativados (Fig 8B).

M $\phi$  ativados têm grande capacidade fagocítica, sendo assim apresentam grande quantidade de vesículas. Quando observados em microscopia confocal, os M $\phi$  tratados com CA apresentaram grande número de projeções citoplasmáticas onde foram observadas inúmeras vesículas de baixo pH (Fig. 8D e 8E). Células com

essa morfologia foram observadas em grande quantidade apenas nesse grupo. Nos grupos controles essas células foram raramente observadas e a maioria não continha grande quantidade de vesículas ácidas (Fig. 8C).

Como já foi descrito, o tratamento com CA aumenta a capacidade endocítica dos M $\phi$  (Lopes et al., 2006), assim como a produção de moléculas envolvidas na defesa contra patógenos (de Oliveira et al., 2006). A observação de vesículas ácidas dentro das projeções corrobora o fato do CA aumentar a capacidade de defesa dessas células, pois assim a eficiência da destruição de patógenos é aumentada. Quanto mais próximas da membrana plasmática estiverem as vesículas, mais rápido elas se unirão aos endossomas, e mais rápida será a digestão. O próximo passo é quantificar essas vesículas, uma vez que, talvez, o CA esteja apenas modificando a distribuição dessas, e não aumentando sua quantidade.

Foram observados também corpos lipídicos margeando a membrana plasmática (Fig. 8D). Lopes, em 2004, demonstrou que M $\phi$  tratados com CA apresentam diminuição de corpos lipídicos. O consumo dessas organelas ricas em ácido aracdônico pode estar relacionado com a síntese de mediadores inflamatórios e com a biogênese de membranas. Quando ativados, os M $\phi$  aumentam seu volume citoplasmático e lançam muitas projeções (Fig. 8D e 8E). Nesse caso, as reservas lipídicas provavelmente estão sendo incorporadas à membrana plasmática quando da formação de projeções.



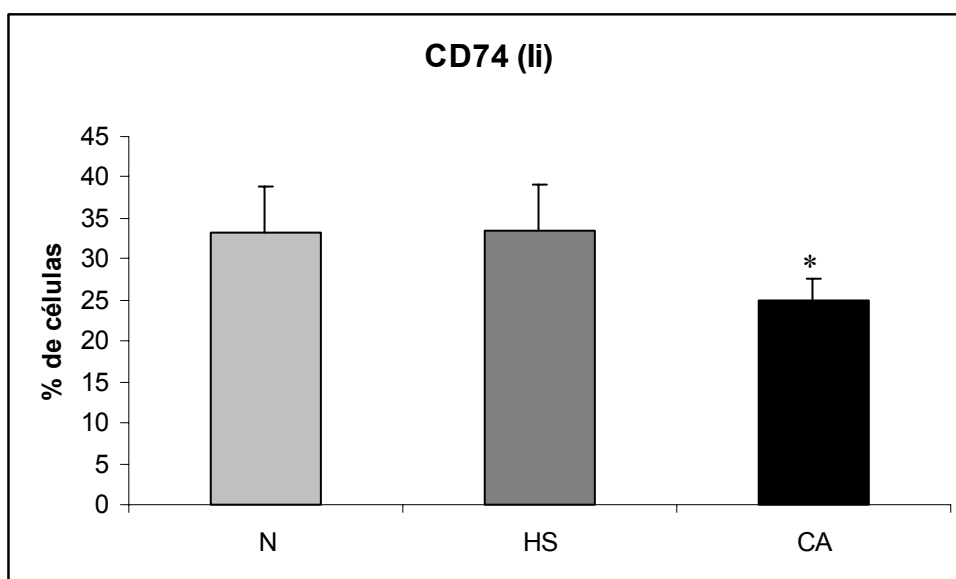
**FIGURA 8 – MARCAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA.** Os Mφ provenientes de tratamento *in vitro* foram incubados com 5 μg/ml de laranja de acridina e observados em microscópio confocal, com objetiva de 60x. **Fig. 8A** – Mφ controle observados em DIC. Seta verde – Mφ residente. Barra: 20 μm. **Fig. 8B** – Mφ tratados observados em DIC. Seta vermelha – Mφ ativado. Barra: 20 μm. **Fig. 8C** – Mφ residente do grupo controle corado com laranja de acridina. Barra: 5 μm. **Fig. 8D e 8E** – Mφ ativados do grupo CA corado com laranja de acridina. Observa-se uma grande quantidade de vesículas ácidas dentro das inúmeras projeções citoplasmáticas. Seta branca – corpo lipídico. Barra: 5 μm. Dados relativos a três experimentos independentes em triplicata.

### 5.3. Detecção de CD74(li)

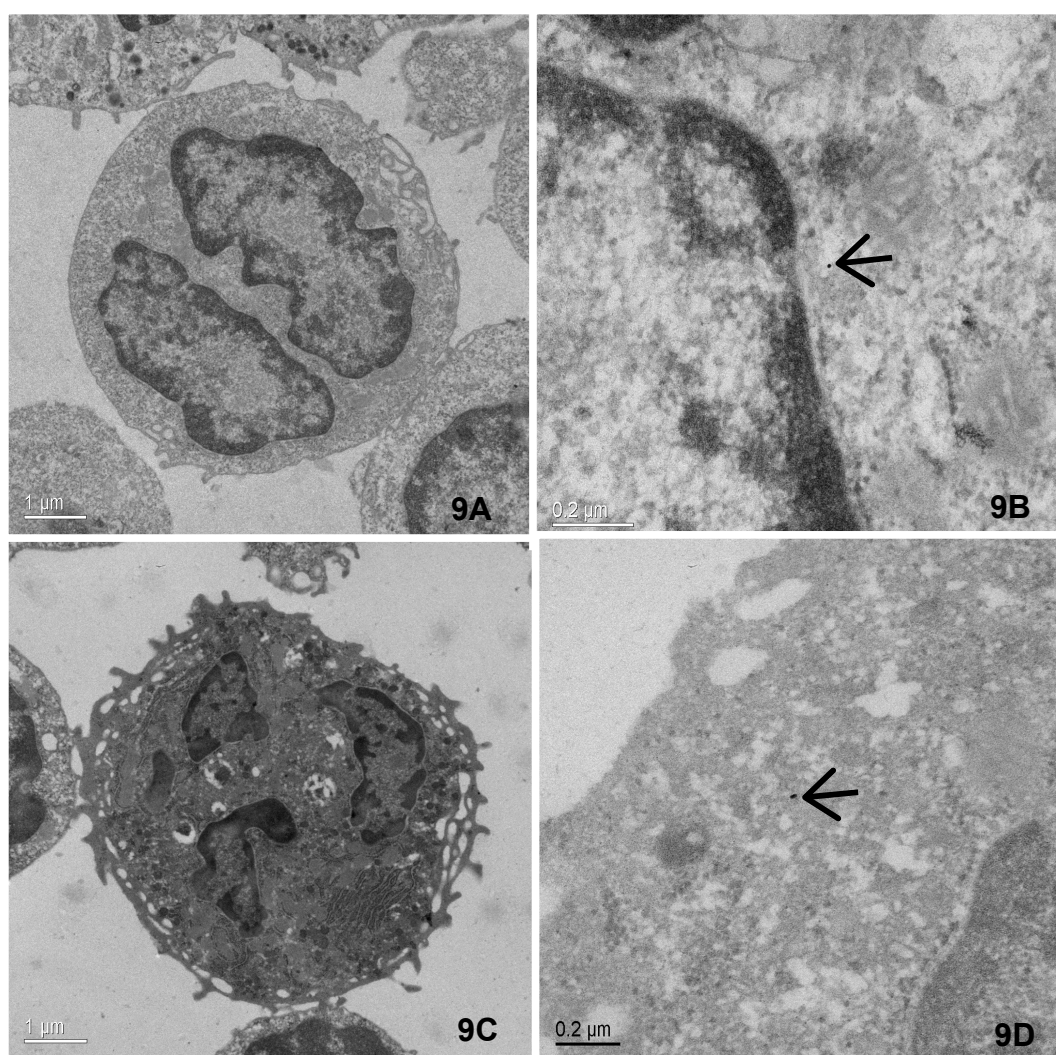
O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) possui papel crítico no sistema imunitário através da apresentação de antígenos. A função das proteínas do MHC de classe II é formar complexos contendo peptídeos antigênicos exógenos na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs) os quais são reconhecidos por linfócitos T. A cadeia invariante associada ao MHC de classe II – CD74(li) – possui importante papel nesse processo, influenciando a expressão de moléculas do MHC de classe II e a apresentação de antígenos (Badve et al., 2002). A formação das moléculas do MHC II é iniciada no retículo endoplasmático, pela associação das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  com a cadeia invariante. A cadeia invariante ocupa o sítio de ligação de antígenos do heterodímero de MHC II, impedindo a ligação com antígenos. Apenas após a sua clivagem é que os antígenos podem se ligar ao MHC II para apresentação (Pieters, 1997).

A detecção do CD74 (li) foi realizada em células do lavado peritoneal de camundongos tratados *in vivo*. Diferenças significativas foram observadas no grupo CA quando comparado com o grupo controle. A análise através de citometria de fluxo mostrou diminuição de células expressando CD74 (li) no grupo CA (Graf. 4). A observação em MET foi similar. Encontrou-se mais células marcadas no grupo normal que no grupo CA (Fig. 9A – 9D).

Trabalhos recentes sobre o mecanismo envolvido na resposta imunitária antitumoral indicam que o CD74 (li) é uma das moléculas envolvidas com imunossupressão, uma vez que o aumento da expressão dessa molécula inibe a apresentação de antígenos pelas moléculas do MHC de classe II (Ishigami et al., 2001). Através da inibição do CD74 (li) e o aumento de proteínas de classe I e II pode-se induzir uma potente resposta imunitária antitumoral (Wang et al., 2005). Sendo assim, a diminuição da expressão do CD74 (li) nas células tratadas com CA pode potencializar a resposta antitumoral. De fato, Sato et al. em 2005 demonstraram o aumento da resposta imunitária de camundongos portadores de sarcoma 180 tratados com CA. Entretanto, muitos outros experimentos envolvendo moléculas do MHC devem ser realizados para tentar elucidar os efeitos do CA sobre essas moléculas.



**GRÁFICO 4 – DETECÇÃO DE CD74 (li).** Após tratamento *in vivo* os M $\phi$  foram permeabilizados, fixados e incubados com anticorpo monoclonal anti CD74 (li) conjugado com FITC e analisados em citômetro de fluxo FACSCalibur. O grupo CA apresentou diminuição estatisticamente significativa de CD74 (li). Média + desvio padrão relativos a três experimentos independentes em triplicata, analisados com ANOVA e teste de Tukey \*P < 0,05.



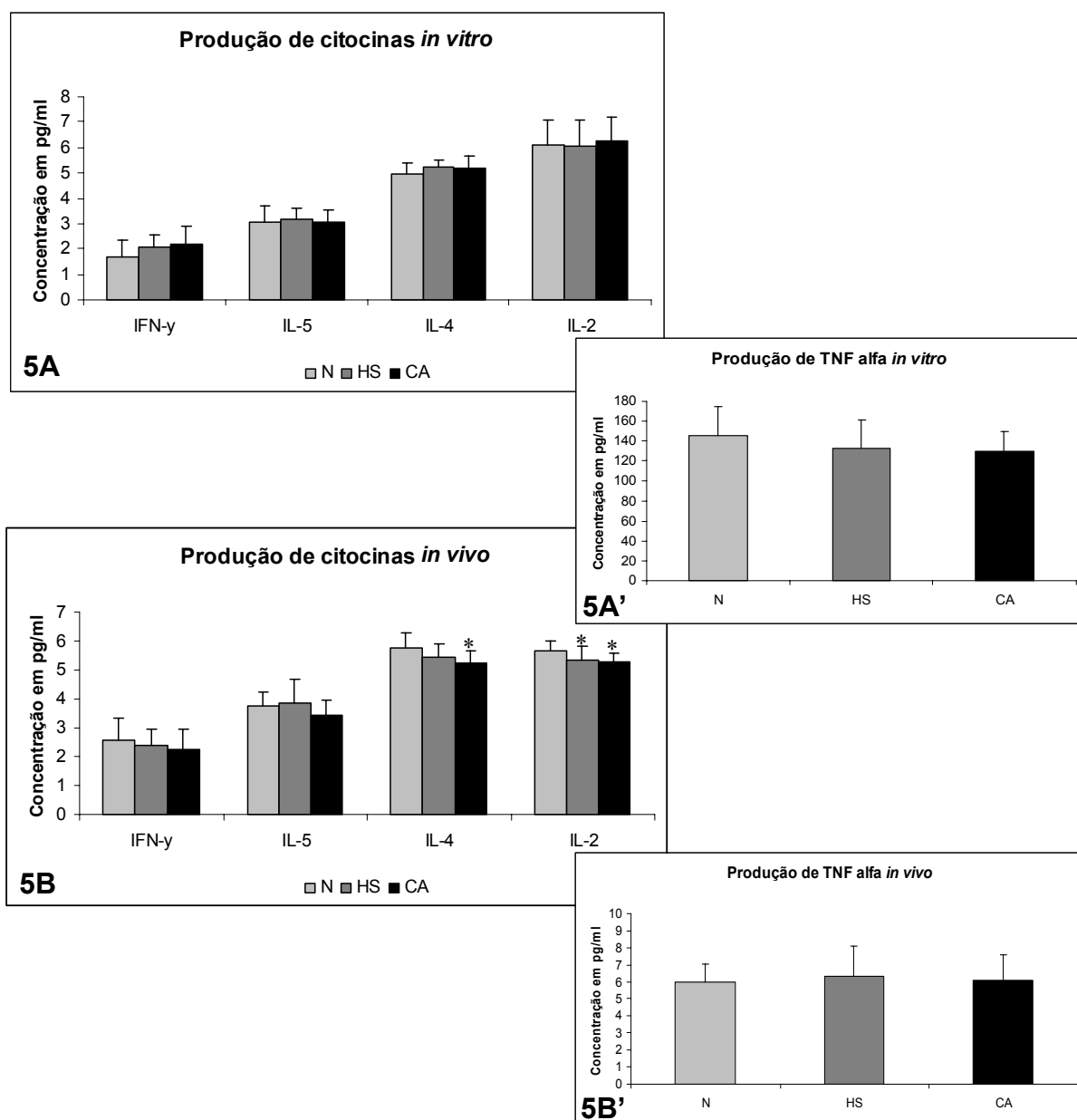
**FIGURA 9** – IMUNOMARCAÇÃO PARA CD74 (li). Os Mφ provenientes de tratamento *in vivo* foram incubados com anticorpo anti CD74 (li) e proteína A complexada com ouro coloidal 10nm. Após a incubação as células foram fixadas e processadas para MET. O grupo CA, aparentemente, apresentou menos marcação que o grupo normal. **Fig. 9A** – Mφ do grupo N com morfologia de residente. **Fig. 9C** – Mφ do grupo CA com morfologia de ativado. **Fig. 9B e 9D** – células do grupo N apresentando marcação para CD74 (li). Flechas apontando para ouro 10nm representando a localização do CD74 (li). Eletronmicrografias provenientes de três experimentos independentes em triplicata.

#### 5.4. Detecção da produção de citocinas

Outra característica de M $\phi$  ativados é capacidade de produzir citocinas. As citocinas influenciam o comportamento biológico das próprias células produtoras e de diferentes tipos celulares. Elas possuem papel decisivo em determinar o status imunitário de um determinado organismo. A integridade do sistema imunitário é controlada por respostas celulares que estimulam a produção de citocinas (Rees, 1992). Como o CA ativa M $\phi$ , provavelmente ele atua na produção de citocinas.

Para a detecção das citocinas produzidas pelos M $\phi$  tratados ou não com o CA foi utilizado um kit específico para detecção de citocinas – Mouse Th1/Th2 cytokine cytometric bead array (CBA) kit da BD Pharmingen. O sobrenadante dos M $\phi$  foi incubado com os anticorpos e os “beads”, e lido em citômetro de fluxo FACSCalibur. Aparentemente o tratamento com CA não modifica a produção de citocinas por M $\phi$  após 48 horas de cultivo (Graf. 5A). Piemonte e Buchi em 2002 mostraram a diminuição da produção de TNF $\alpha$  *in vitro* pelo CA. Porém esse estava muito aumentado no grupo controle. Provavelmente os animais estavam com alguma patologia. Nossos experimentos mostraram que a produção de TNF $\alpha$ , pelas células tratadas *in vitro*, apresentou tendência de diminuição, porém não apresentou diferença estatisticamente significativa (Graf. 5A'). Já no tratamento *in vivo* não foram observadas mudanças, provavelmente devido à interação dos M $\phi$  com outros tipos celulares.

Os M $\phi$  obtidos de camundongos tratados *in vivo* com CA apresentaram diminuição da produção de IL-2 e IL-4. Não foram encontradas diferenças na produção das outras citocinas testadas IL-5, IFN $\gamma$  (Graf. 5B) e TNF $\alpha$  (Graf. 5B'). Cote-Sierra et al. em 2004 demonstraram que a neutralização *in vivo* de IL-2 inibe a produção de IL-4 em dois modelos experimentais. A IL-4 possui papel importante em regular atividades inflamatórias em M $\phi$ . Observou-se a diminuição da produção de IL-4, e também o aumento da atividade da NADPH oxidase por M $\phi$  tratados com CA, fato esse suportado pela literatura. Zhou, Lin e Murtaugh em 1995, demonstraram que a IL-4 é uma das citocinas regulatórias de M $\phi$ . Eles descreveram a diminuição da produção de anion superóxido em M $\phi$  devido à supressão da atividade da NADPH oxidase pela IL-4.



**GRÁFICO 5 – PRODUÇÃO DE CITOCINAS.** Após tratamento *in vitro* e *in vivo* o sobrenadante dos M $\phi$  foi utilizado para incubação com os *beads* de detecção de citocinas do kit mouse Th1/Th2 cytokine CBA. As amostras marcadas foram lidas em citômetro de fluxo FACSCalibur. **Graf. 5A** – produção de IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-4 e IL-2 por M $\phi$  tratados ou não com CA *in vitro*. **Graf. 5A'** – produção de TNF- $\alpha$  por M $\phi$  tratados ou não com CA *in vitro*. **Graf. 5B** – produção de IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-4 e IL-2 por M $\phi$  tratados ou não com CA *in vivo*. **Graf. 5B'** – produção de TNF- $\alpha$  por M $\phi$  tratados ou não com CA *in vivo*. Média + desvio padrão relativos a três experimentos independentes em triplicata, analisados com ANOVA e teste de Tukey \*P < 0.05.



A IL-2 está envolvida no desenvolvimento da resposta imunitária antígeno específica e não específica. Ela influencia o comportamento de outros tipos celulares, e vários trabalhos têm demonstrado que a IL-2 é um fator de crescimento essencial para a função de células B, eosinófilos, monócitos e macrófagos (Rees, 1992). Sbarba et al. em 1996 demonstraram que a IL-2 estimula *downregulation* do receptor do fator estimulador de colônia de M $\phi$  (M-CSF.R). O fator estimulador de colônia de M $\phi$  (M-CSF) é o principal fator de crescimento de fagócitos mononucleares, suportando sua sobrevivência e estimulando a proliferação e diferenciação. Observou-se a diminuição *in vivo* da produção de IL-2 por M $\phi$  tratados com CA. A efetividade da população de M $\phi$  depende do balanço entre suas respostas a estímulos proliferativos ou de ativação. Essas respostas tendem a ser antagonistas, e a proliferação de células ativadas é usualmente reduzida. Sendo assim a diminuição de IL-2 do meio celular facilita a eficácia dos M $\phi$  tratados com CA, os quais tendem a assumir estados específicos funcionais. Observou-se também a diminuição da produção de IL-2 pelo grupo HS. Observou-se que soluções hidro-alcoólicas sucussionadas apresentam alguns efeitos em M $\phi$  porém esses dados não foram publicados.

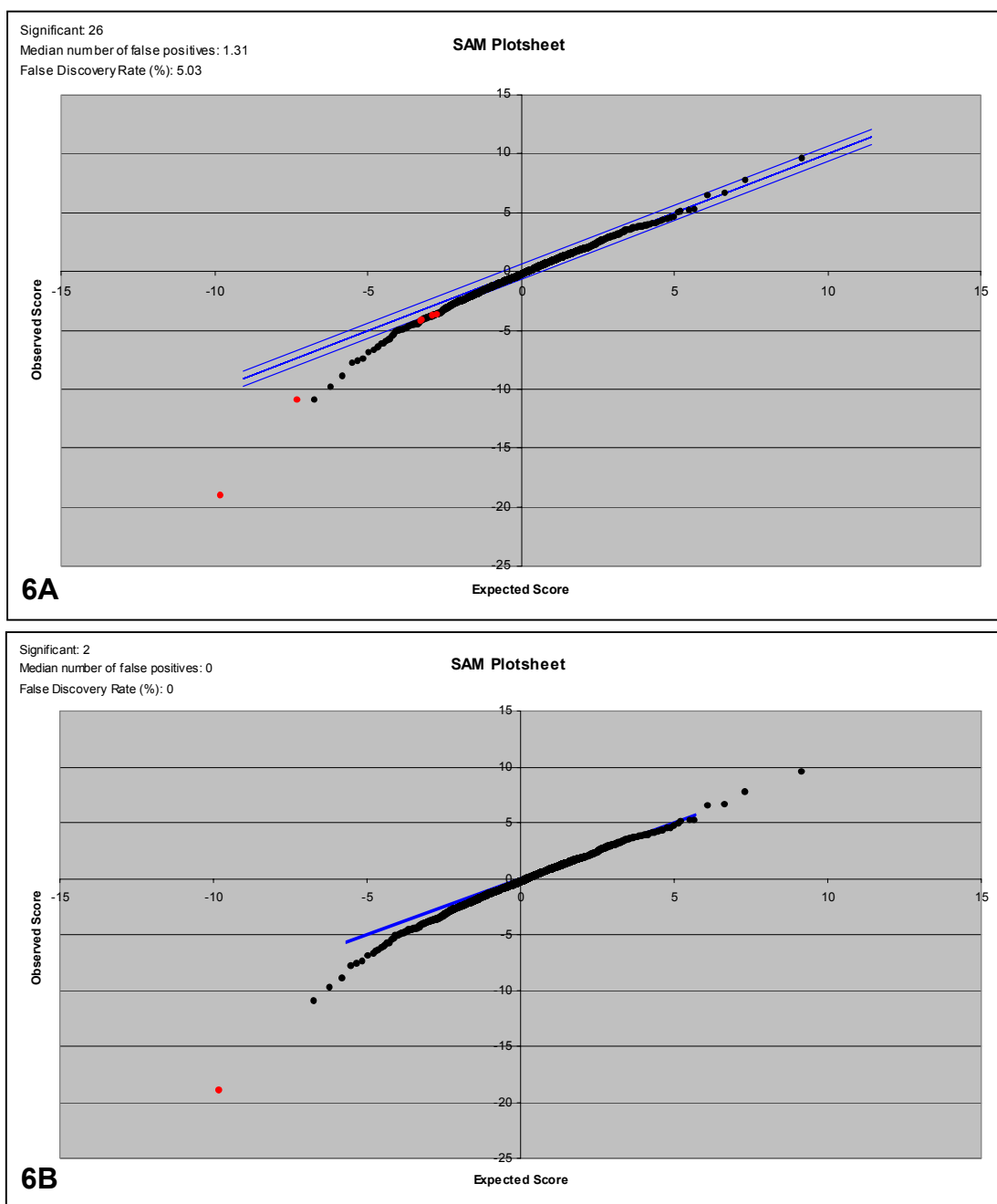
### 5.5. Expressão gênica

Uma vez que o medicamento CA ativa M $\phi$  e altera a produção de ROS, NO e citocinas resolveu-se averiguar se esse medicamento atua em nível gênico. O padrão de genes expressos em uma célula pode fornecer informações detalhadas sobre seu estado funcional (DeRisi, Iyer e Brown, 1997). Os experimentos de expressão gênica foram realizados apenas com tratamento *in vivo*. Para isso, foram utilizados 4 grupos: Canova (CA), solução hidro-alcoólica (H), solução hidro-alcoólica sucussionada (Hs) e controle ou normal (N), em 3 experimentos distintos. Após a análise estatística observou-se que os M $\phi$  do grupo CA apresentaram modificações no perfil de genes expressos quando comparados com os grupos controles. Esses experimentos apenas delinearam um perfil de ação do CA, e sendo assim, muita pesquisa ainda deve ser feita para corroborar os dados obtidos.

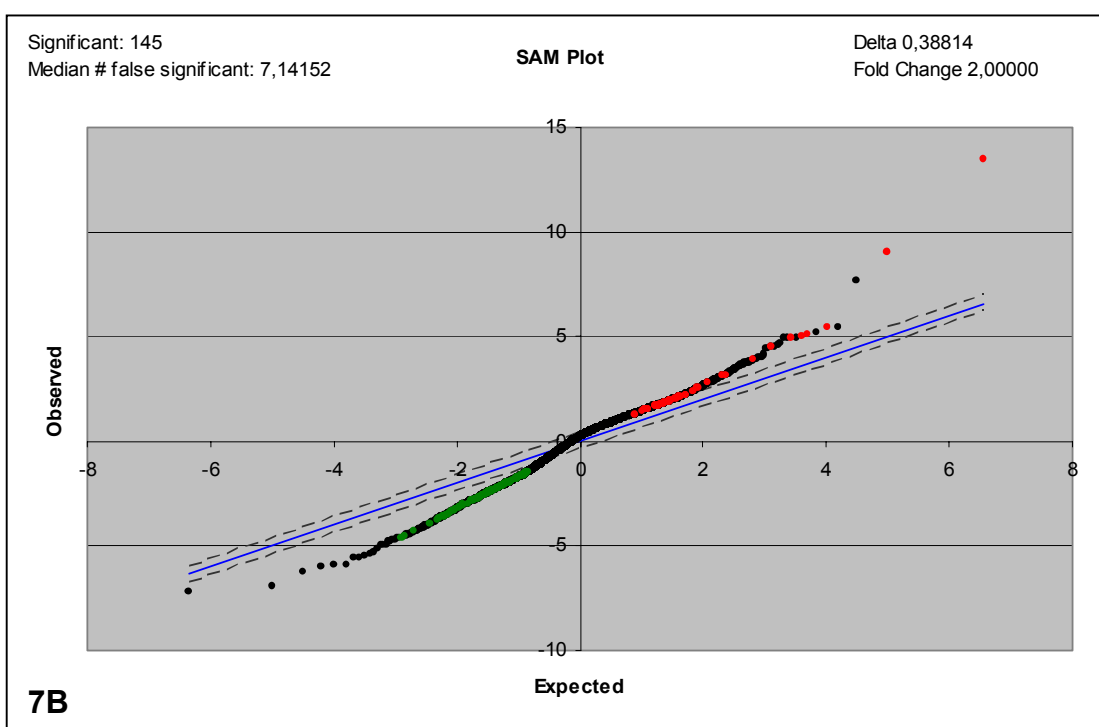
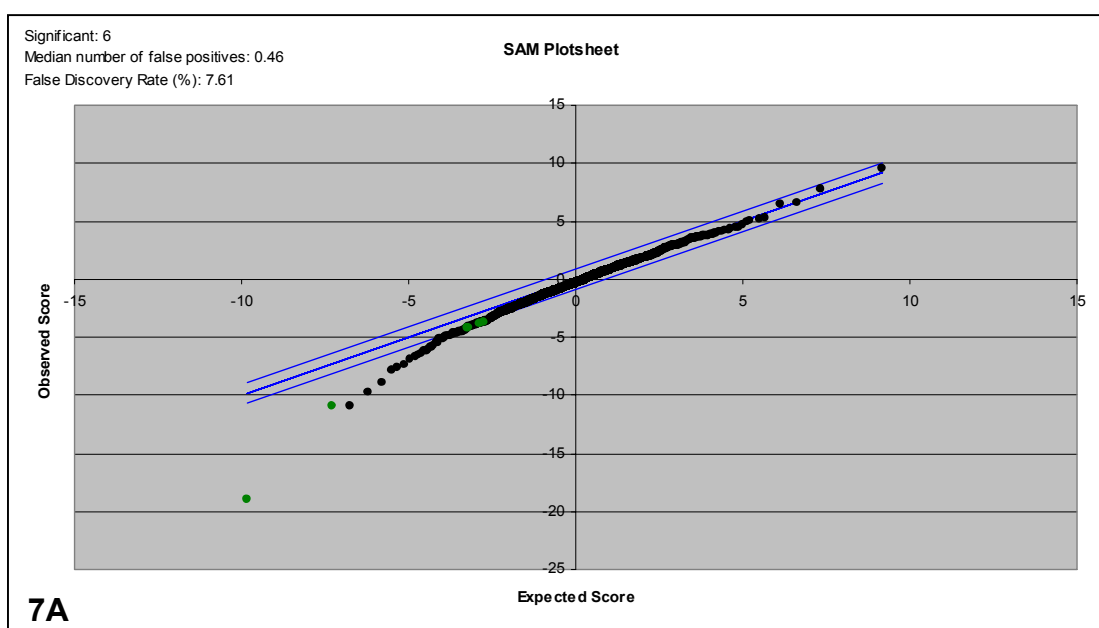
### **O CA estimula mudanças transcricionais em M $\phi$**

A grande plasticidade e diversidade das respostas imunitárias derivam da modulação da expressão gênica das células (Ohmori e Hamilton, 1994). Observou-se nos experimentos de expressão gênica que os grupos N, H, HS quando comparados entre si não apresentam muitas diferenças significativas. Poucos foram os genes diferencialmente expressos (DEGs) encontrados com as interações N x H (Graf. 6A), N x HS (Graf. 6B) e H x HS (Graf. 7A). Para se analisar esses gráficos, deve-se ter em mente que, os genes que se apresentam entre as linhas azuis não apresentam diferenças na sua expressão. Genes que apresentam diferença de expressão entre os grupos analisados estão fora das linhas azuis. Como nesse experimento os critérios para a seleção dos DEGs foram de possuir *fold change* de no mínimo 2 vezes e FDR de 5%, apenas alguns poucos genes (de todos os que se encontravam fora das linhas azuis) foram considerados como diferencialmente expressos. Os DEGs encontrados nas comparações entre esses grupos são visualizados nas tabelas 1, 2 e 3. Esses estão envolvidos principalmente no ciclo celular e na transdução de sinal.

Após comparação entre os grupos controles, observamos que não haviam grandes diferenças significativas entre eles. Portanto resolvemos utilizar o grupo HS para comparar com o grupo CA, pois qualquer variação encontrada seria resposta apenas do medicamento. Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas quando esses dois grupos foram comparados (Graf. 7B). Foram encontrados 147 DEGs, 45 aumentados (tabela 4) e 102 diminuídos (tabela 5). Na tentativa de facilitar a análise dos DEGs encontrados, foi analisada apenas a relação entre o grupo CA x HS. Para a discussão foram escolhidos alguns genes, sendo que a maioria deles estão de alguma forma relacionados com pesquisas anteriores.



**GRÁFICO 6** – SAM PLOT DE COMPARAÇÃO DOS GRUPOS. Após tratamento *in vivo* o RNA total dos Mφ foi isolado e utilizado para hibridização em GeneChips® MG74Av2 (Affymetrix). A análise estatística foi realizada com o método de SAM. **Graf. 6A** - sam plot de comparação dos grupos N x H. **Graf. 6B** - sam plot de comparação dos grupos N x HS. Pontos vermelhos – genes com expressão aumentada no grupo N.



**GRÁFICO 7 – SAM PLOT DE COMPARAÇÃO DOS GRUPOS.** Após tratamento *in vivo* o RNA total dos M $\phi$  foi isolado e utilizado para hibridização em GeneChips<sup>®</sup> MG74Av2 (Affymetrix). A análise estatística foi realizada com o método de SAM. **Graf. 7A** - sam plot de comparação dos grupos H x HS. **Graf. 7B** - sam plot de comparação dos grupos CA x HS. Pontos vermelhos – genes com expressão aumentada. Pontos verdes – genes com expressão diminuída.

**TABELA 1 – DEGs ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS N X H**

<b>Fold change</b>	<b>Sinalização celular e transdução de sinal</b>	<b>Sigla</b>
<b>2,03</b>	ras homology gene family, member B	Rhob
<b>2,51</b>	endothelin receptor type B	Ednrb
<b>3,95</b>	chemokine orphan receptor 1	Cmkor1
<b>3,75</b>	Thrombomodulin	Thbd
<b>6,39</b>	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	Cxcr4
<b>Citoesqueleto / adesão celular</b>		
<b>2,51</b>	activated leukocyte cell adhesion molecule	Alcam
<b>2,83</b>	secreted phosphoprotein 1	Spp1
<b>Resposta imune</b>		
<b>2,07</b>	Haptoglobin	Hp
<b>Metabolismo</b>		
<b>2,10</b>	arylsulfatase A	Arsa
<b>11,58</b>	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3	Gdpd3
<b>Transporte</b>		
<b>2,56</b>	hemoglobin alpha, adult chain 1	Hba-a1
<b>Ciclo celular</b>		
<b>3,01</b>	FBJ osteosarcoma oncogene	Fos
<b>3,55</b>	dual specificity phosphatase 1	Dusp1
<b>2,83</b>	serum/glucocorticoid regulated kinase	Sgk
<b>2,49</b>	apoptosis inhibitor 6 - CD5 antigen-like	Cd5l
<b>2,06</b>	regulator of G-protein signaling 2	Rgs2
<b>2,11</b>	PERP, TP53 apoptosis effector	Perp
<b>Transcrição</b>		
<b>2,43</b>	nuclear factor, interleukin 3, regulated	Nfil3
<b>2,00</b>	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2	Smarca2
<b>2,06</b>	Sjogren syndrome antigen B	Ssb
<b>Outros</b>		
<b>2,06</b>	CDNA sequence BC023892	BC023892
<b>2,08</b>	RIKEN cDNA 2310015N07 gene	2310015N07Rik
<b>2,22</b>	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 6a	Serpnb6a
<b>2,01</b>	cDNA sequence BC025546	BC025546
<b>2,02</b>	RIKEN cDNA 1500016H10 gene	---
<b>2,03</b>	CD24a antigen	Cd24a

**TABELA 2 – DEGs ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS N X HS**

<b>Fold change</b>	<b>Resposta imune</b>	<b>Sigla</b>
<b>6,47</b>	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	Cxcr4
<b>0,45</b>	glycoprotein 49 A /// leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 4	Gp49a /// Lilrb4

**TABELA 3 – DEGs ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS H X HS**

Fold change	Sinalização celular e transdução de sinal	Sigla
0,38	Endothelin receptor type B	Ednrb
<b>Resposta imune</b>		
0,49	peptidoglycan recognition protein 1	Pglyrp1
0,46	Haptoglobin	Hp
<b>Transcrição - transcription</b>		
0,48	nuclear factor, interleukin 3, regulated	Nfil3
<b>Outros</b>		
0,38	coactosin-like 1 (Dictyostelium)	Cotl1
0,49	expressed sequence AA536743	AA536743

**TABELA 4 – DEGs AUMENTADOS ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS CA X HS (Continua)**

Fold change	Sinalização celular e transdução de sinal	Sigla
2,70	metallothionein 1	Mt1
7,80	metallothionein 2	Mt2
2,07	Olfactory receptor 71	Olf71
5,49	suppressor of cytokine signaling 3	Socs3
2,15	suppressor of cytokine signaling 3	Socs3
<b>Citoesqueleto / adesão celular</b>		
2,34	actin, beta, cytoplasmic	Actb
2,05	dynein, cytoplasmic, intermediate chain 1	Dncic1
2,15	Talin	Tln
2,61	syndecan 4	Sdc4
<b>Resposta imune</b>		
2,42	histocompatibility 2, class II antigen E beta	H2-Eb1
4,57	heme oxygenase (decycling) 1	Hmox1
5,60	HLA-B-associated transcript 9	Bat9
<b>Metabolismo</b>		
2,54	mevalonate kinase	Mvk
2,70	GM2 ganglioside activator protein	Gm2a
<b>Transporte</b>		
4,67	adaptor protein complex AP-2, alpha 2 subunit	Ap2a2
6,18	hemoglobin alpha, adult chain 1	Hba-a1
17,46	hemoglobin alpha, adult chain 1	Hba-a1
3,92	hemoglobin, beta adult major chain	Hbb-b1
2,19	thioredoxin reductase 3	Txnrd3
<b>Ciclo celular</b>		
3,60	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	Gadd45b
2,15	Talin	Tln
2,19	RIKEN cDNA 1700051C09 gene	1700051C09Rik

**TABELA 4 – DEGs AUMENTADOS ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS CA X HS (Conclusão)**

Fold change	Transcrição	Sigla
2,55	ribosomal protein S28	Rps28
6,46	Small nuclear ribonucleoprotein B	Snrpb
2,16	centaurin, gamma 3	Centg3
7,14	heat shock protein 1A	Hspa1a
5,60	heat shock protein 1B	Hspa1b
4,66	splicing factor 3a, subunit 2	Sf3a2
3,43	sequestosome 1	Sqstm1
<b>Outros</b>		
2,23	fatty acid desaturase 1	Fads1
3,03	mitochondrial ribosomal protein S18A	Mrps18a
2,09	protease, serine, 25	Prss25
<b>Função desconhecida</b>		
2,30	P53-variant (p53)	---
2,25	Aspartyl aminopeptidase	Dnpep
2,14	Hypothetical gene supported by BC030401 (LOC380819), mRNA	---
3,14	Zinc finger, CCHC domain containing 7	Zcchc7
2,23	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 4	Slc39a4
4,65	RIKEN cDNA 9430029L20 gene	9430029L20Rik
2,59	RIKEN cDNA A430104N18 gene	A430104N18Rik
3,92	DNA segment, Chr 14, Wayne State University 89, expressed	D14Wsu89e
2,12	ephrin A3	Efna3
2,39	erythroid differentiation regulator 1	Erdr1
2,01	expressed sequence R74740	R74740
2,19	RNA binding motif protein 9	Rbm9
2,56	Secretin	Sct

**TABELA 5 – DEGs DIMINUÍDOS ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS CA X HS (Continua)**

Fold change	Sinalização celular e transdução de sinal	Sigla
0,43	annexin A1	Anxa1
0,29	expressed sequence AW111922	AW111922
0,42	expressed sequence AW111922	AW111922
0,43	protein tyrosine phosphatase, receptor type, O	Ptpro
0,43	RAB9, member RAS oncogene family	Rab9
0,38	RAS p21 protein activator 4	Rasa4
<b>Citoesqueleto / adesão celular</b>		
0,34	activated leukocyte cell adhesion molecule	Alcam
0,39	integrin alpha M	Itgam

**TABELA 5 – DEGs DIMINUÍDOS ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS CA X HS (Continuação)**

<b>Fold change</b>	<b>Resposta imune</b>	<b>Sigla</b>
0,48	bone marrow stromal cell antigen 1	Bst1
0,40	chemokine (C-C motif) ligand 5	Ccl5
0,49	chemokine (C-C) receptor 2	Ccr2
0,43	CD1d1 antigen	Cd1d1
0,31	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	Cxcr4
0,49	dual specificity phosphatase 1	Dusp1
0,45	guanylate nucleotide binding protein 1	Gbp1
0,36	guanylate nucleotide binding protein 2	Gbp2
0,37	histocompatibility 2, Q region locus 7	H2-Q7
0,47	interferon inducible protein 1	Ifi1
0,42	interferon gamma inducible protein	Ifi47
0,29	interferon activated gene 202B	Ifi202b
0,36	interferon activated gene 205	Ifi205
0,46	interferon gamma induced GTPase	Igtp
0,50	proteosome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional protease 2)	Psmb9
<b>Metabolismo</b>		
0,46	aldehyde dehydrogenase 9, subfamily A1	Aldh9a1
0,47	adenylosuccinate synthetase 2, non muscle	Adss2
0,47	glucose-6-phosphate dehydrogenase X-linked	G6pdx
0,41	glyoxalase 1	Glo1
0,43	glycogenin 1	Gyg1
<b>Transporte</b>		
0,45	RIKEN cDNA 1110032D12 gene	1110032D12Rik
0,49	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 5	Arl6ip5
0,41	ATPase, Ca++ transporting, ubiquitous	Atp2a3
0,50	chloride channel 3	Clcn3
0,40	cytochrome b-245, beta polypeptide	Cybb
0,49	electron transferring flavoprotein, alpha polypeptide	Etfa
0,48	fatty acid binding protein 7, brain	Fabp7
0,49	sorting nexin 10	Snx10
0,45	syntaxin 3	Stx3
0,47	syntaxin binding protein 3	Stxbp3
0,38	thioredoxin domain containing 7	Txndc7
0,34	thioredoxin domain containing 7	Txndc7
<b>Ciclo celular</b>		
0,38	MAD2 (mitotic arrest deficient, homolog)-like 1 (yeast)	Mad2l1
0,41	antigen identified by monoclonal antibody Ki 67	Mki67
0,36	schlafen 1	Slfn1
0,49	schlafen 2	Slfn2
0,46	schlafen 4	Slfn4
0,49	transforming growth factor, beta 2	Tgfb2



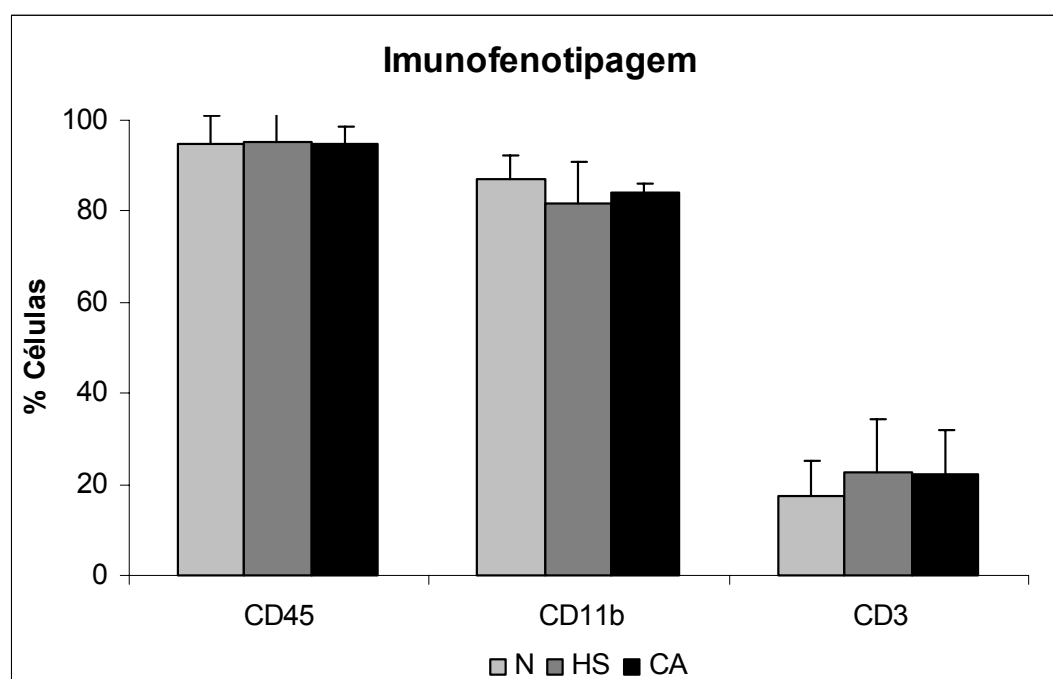
**TABELA 5 – DEGs DIMINUÍDOS ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS CA X HS (Continuação)**

Fold change	Transcrição	Sigla
0,46	RIKEN cDNA 1110054N06 gene	1110054N06Rik
0,36	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	Cited2
0,40	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA subunit 2	Cstf2
0,48	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 36	Dhx36
0,47	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6	Eif3s6
0,46	fragile X mental retardation syndrome 1 homolog	Fmr1
0,43	GA repeat binding protein, alpha	Gabpa
0,47	pre B-cell leukemia transcription factor 3	Pbx3
0,50	p300/CBP-associated factor	Pcaf
0,37	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2	Smarca2
0,23	signal transducer and activator of transcription 1	Stat1
0,44	TAF9 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	Taf9
0,39	transcription elongation factor A (SII) 1	Tcea1
0,48	tripartite motif protein 30	Trim30
0,37	Wilms' tumour 1-associating protein	Wtap
0,48	zinc finger protein 62	Zfp62
0,47	zinc finger protein 265	Zfp265
<b>Outros</b>		
0,44	formyl peptide receptor, related sequence 2	Fpr-rs2
0,44	macrophage receptor with collagenous structure	Marco
0,45	mitochondrial ribosomal protein L36	Mrpl36
0,39	X-linked myotubular myopathy gene 1	Mtm1
0,44	numb gene homolog (Drosophila)	Numb
0,44	Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 3	Pdk3
0,40	Quaking	Qk
0,50	ribophorin II	Rpn2
0,35	Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	Sdha
0,42	sestrin 1	Sesn1
0,37	signal sequence receptor, gamma	Ssr3
0,48	striatin, calmodulin binding protein 3	Strn3
0,32	T-cell specific GTPase	Tgtp
0,43	Ubiquitin-conjugating enzyme E2E 1, UBC4/5 homolog (yeast)	Ube2e1
0,40	vesicle-associated membrane protein 3	Vamp3

**TABELA 5 – DEGs DIMINUÍDOS ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS CA X HS (Conclusão)**

Fold change	Função desconhecida	Sigla
0,48	---	---
0,44	Diabetic nephropathy-related gene 1 mRNA, partial sequence	---
0,41	Transcribed sequence with moderate similarity to protein sp:P00722 (E. coli) BGAL_ECOLI Beta-galactosidase	---
0,41	---	---
0,49	Transcribed sequences	---
0,49	RIKEN cDNA 0610010K14 gene	0610010K14Rik
0,44	RIKEN cDNA 1110021E09 gene	1110021E09Rik
0,44	RIKEN cDNA 2310015N07 gene	2310015N07Rik
0,45	RIKEN cDNA 2610042L04 gene	2610042L04Rik
0,44	RIKEN cDNA 2610205H19 gene	2610205H19Rik
0,47	RIKEN cDNA 6330442E10 gene	6330442E10Rik
0,45	RIKEN cDNA 9130022A11 gene	9130022A11Rik
0,49	expressed sequence AI265322	AI265322
0,46	expressed sequence AI788669	AI788669
0,44	expressed sequence AW112010	AW112010
0,41	DNA-damage-inducible transcript 4	Ddit4
0,46	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	Hnrph2
0,49	influenza virus NS1A binding protein	Ivns1abp
0,37	LIM domain only 7	Lmo7
0,48	open reading frame 18	ORF18
0,36	ring finger protein 138	Rnf138

A ativação de M $\phi$  é caracterizada, entre outros critérios, por mudanças celulares e ultraestruturais. Uma vez que muitas dessas atividades funcionais requerem aumento da síntese protéica, o conteúdo de RNA celular pode ser usado como parâmetro para identificar células com atividades funcionais aumentadas. Sendo assim a análise da expressão gênica de M $\phi$  tratados com CA pode fornecer informações detalhadas sobre seu estado funcional, além de contribuir para o entendimento do seu modo de ação. O RNA extraído das células do lavado peritoneal era proveniente principalmente de M $\phi$  (Fig.10), uma vez que foi realizada a imunofenotipagem das células do lavado.



**FIGURA 10** – IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS. Após tratamento *in vivo* o lavado peritoneal foi incubado com anticorpos monoclonais anti CD45 (leucócitos em geral), CD11b (monócitos/macrófagos) e CD3 (linfócitos T, principalmente) conjugados com PE e analisados em citômetro de fluxo FACSCalibur. Observou-se que os monócitos/macrófagos são as células mais abundantes no lavado. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Dados relativos a três experimentos independentes em triplicata, analisados com ANOVA.

Através dos experimentos de expressão gênica foi possível verificar que o CA estimula mudanças transcricionais nos M $\phi$ . O tratamento induziu o aumento e a diminuição da expressão de alguns genes, observada através do *fold change*. A análise do *fold change* detecta apenas genes que são diferencialmente expressos, devido apenas à variação biológica (Irizarry et al., 2003). Para o melhor entendimento da ação do CA em M $\phi$ , grupos foram criados baseados na função dos genes.

#### **5.5.1. Processos transcricionais e traducionais**

Muitas mudanças celulares que acompanham a ativação dos M $\phi$  dependem da modulação específica da expressão gênica. Em eucariotos a expressão é controlada em vários níveis incluindo mecanismos transcricionais, pós-transcricionais, traducionais e modificações pós-transcricionais (Ohmori and Hamilton, 1994). O grupo CA apresentou aumento na expressão de genes relacionados com proteínas envolvidas na transcrição, processamento de RNA (splicing), regulação gênica e tradução.

Elementos regulatórios são conhecidos por agir através do reconhecimento de uma sequência específica e pela ligação a fatores protéicos específicos (Ohmori and Hamilton, 1994). A Centaurina gamma-3 (Centg3) é uma proteína necessária à regulação gênica, e sua transcrição estava aumentada no grupo CA.

A maioria dos genes de eucariotos contém sequência não codificantes (introns) que devem ser removidas do transcrito primário antes da tradução em proteínas (Kambach, Walke e Nagai, 1999). O splicing do mRNA, onde os introns são removidos dos pré-mRNAs, é mediado por um grande número de ribonucleoproteínas denominadas “small nuclear ribonucleoprotein” (snRNP) e não-snRNP. Essas ajudam no reconhecimento do local de splicing, dirigem as mudanças conformacionais e regulam a atividade dos fatores de splicing. Essa união de moléculas é denominada spliceossoma (Bond e James, 2000). Observou-se o aumento da expressão gênica da snRNP-B. As snRNPs nos spliceossomas contém algumas proteínas que são comuns a todas as snRNPs. A proteína B é uma delas. Também foi observado o aumento da expressão do fator de *splicing* 3a (SF3a) pelo

CA. A SF3a reconhece a região 3' dos locais de *splicing* assim que ocorre a formação do spliceossoma (Tanackovic e Krämer, 2005).

Na tradução, a sequência de códons no mRNA dirige a síntese da cadeia polipeptídica. Esse processo ocorre no ribossomo, e o movimento do tRNA e do mRNA no ribossomo é um processo complicado que combina alta velocidade e acurácia. O ribossomo é uma partícula grande e consiste de duas subunidades em todas as espécies (Ramakrishnan, 2002). O ribossomo de mamíferos é composto de 4 espécies de RNAs e aproximadamente 80 proteínas diferentes (Chan, Olvera e Wool, 1991). A expressão gênica da proteína ribossomal S28 e da proteína mitocondrial ribossomal S18A estavam aumentadas no grupo CA.

Mudanças nos perfis transcricionais e traducionais são conseqüências da aumentada atividade dos M $\phi$ . Sendo assim, o aumento da regulação de genes envolvidos nesses processos era esperado.

### **5.5.2. Dinâmica e estrutura celular**

As integrinas fazem parte de uma família de proteínas que conectam os componentes da matriz extracelular com moléculas do citoesqueleto. Interações integrinas-ligante são acompanhadas pela ativação e agrupamento das integrinas na superfície celular, além da transdução dessa ativação para sinais em vias intracelulares. Essas vias são relacionadas com uma grande variedade de eventos como crescimento, diferenciação, ativação, migração e secreção celular (Hynes, 1992). O CA aumentou a expressão de genes relacionados a moléculas ligadas a interações intra e extracelulares.

Piemonte e Buchi em 2002 mostraram que M $\phi$  tratados com CA apresentavam redistribuição dos receptores para fibronectina (integrina  $\alpha_5\beta_1$ ) e de filamentos de actina no citoesqueleto. Nos experimentos de expressão gênica foi observado o aumento da expressão da  $\beta$  actina, corroborando os dados anteriores. O citoesqueleto de actina e sua conexão com integrinas é altamente dinâmico e sujeito a muitos processos regulatórios. Existe uma ligação íntima entre integrinas e a sinalização por fatores de crescimento e citocinas, assim como uma dependência funcional mútua entre integrinas e filamentos de actina. A interação de ligantes com integrinas leva ao agrupamento das integrinas e recrutamento de filamentos de

actina e proteínas sinalizadoras nos domínios citoplasmáticos das integrinas (Brakebusch e Fässler, 2003).

Proteínas ligantes de actina, como a talina, por exemplo, agem como plataformas de transdução de sinal mediado pelas integrinas (Brakebusch e Fässler, 2003). Observou-se o aumento da expressão gênica para a talina. A talina é um componente importante da adesão focal que se liga a múltiplas moléculas de adesão. Ela fisicamente se justapõe a integrinas e a actina intracelular, tanto diretamente através da ligação simultânea ao domínio citoplasmático da integrina quanto indiretamente através da ligação a actina. Em adição ao seu papel estrutural, a talina também parece atuar na regulação da ativação da integrina, na organização da adesão, na estabilização da ligação integrina-actina e na mediação da sinalização via integrina. Ela também é requerida na conexão matriz extracelular-integrina-actina (Nayal, Webb e Horwitz, 2004).

Outra proteína envolvida na adesão que apresentou aumento na expressão gênica foi o sindecan-4. O sindecan é uma proteoglicana heparan sulfato transmembrana que está envolvida na formação e função da adesão focal. Ela parece ser um co-receptor no processo de adesão a uma grande variedade de ligantes extracelulares, modificando as respostas mediadas por integrinas. Apesar disso, as integrinas parecem ser os receptores primários das respostas via sindecan-4 (Woods e Couchman, 2001).

A dinâmica do citoesqueleto é um importante processo celular no “espraiamento” e motilidade celular, assim como na endocitose. O intenso tráfego intracelular necessário para permitir a interação dos fagossomas com os lisossomas é dependente de microtúbulos (Jahraus et al., 1994; Desjardins et al., 1994). O movimento bidirecional dos fagossomas ao longo dos microtúbulos é mediado por dineína e cinesina citoplasmáticas (Rabinowitz et al., 1992; Blocker et al., 1997). O tratamento com o CA induz o aumento da cadeia intermediária da dineína. A dineína participa em várias atividades celulares, incluindo transporte de organelas, organização do citoesqueleto e na mitose (Straube et al., 2001). A cadeia intermediária parece ter papel importante no direcionamento da molécula da dineína para o seu local apropriado na célula (Vaughan et al., 1996). Experimentos anteriores demonstraram que o CA aumenta a habilidade de “espraiamento” dos M $\phi$  e favorece uma resposta imunológica celular contra microorganismos através do

aumento da eficiência da via fagocítica (Lopes et al., 2006). Sendo assim, o aumento da capacidade de M $\phi$  unir fagossomos com lisossomos é essencial para uma fagocitose eficiente.

Moléculas do MHC de classe II são glicoproteínas transmembrana essenciais na apresentação de antígenos gerados em vesículas intracelulares em M $\phi$  e outras APCs aos linfócitos T durante a resposta imunitária (Yun, DeCarlo e Hunter, 1999). O CA aumentou a expressão do antígeno E beta do MHC de classe II.

Esses dados demonstram que o CA além de aumentar a adesão celular, aumenta as conseqüências funcionais dos M $\phi$ , como a capacidade fagocítica e a capacidade de apresentar antígenos via MHC de classe II.

### **5.5.3. Resposta imunitária**

Muitos supressores da sinalização de citocinas (SOCS) e proteínas SH2 induzíveis por citocinas (CIS) regulam a resposta de células imunitárias a citocinas. Além disso, são reguladores fisiológicos chave do sistema imunitário (Kubo, Hanada e Yoshimura, 2003). O supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS 3) estava aumentado nos M $\phi$  tratados com CA. SOCS3 é um regulador positivo de APCs e está envolvido na diferenciação de células T, além de regular a função das células T através da regulação negativa da IL-2 (Kubo et al., 2003). As observações de diminuição da produção da IL-2 pelas células tratadas corroboram a indução do SOCS 3 pelo CA.

Os receptores de efrinas (Eph) são a maior família de proteínas tirosina cinase transmembrana com domínio extracelular capaz de reconhecer sinais do microambiente celular e influenciar a interação célula-célula e a migração celular. Além disso, eles afetam a motilidade e adesão celular através da modulação da atividade de integrinas (Surawska, Ma e Salgia, 2004). Os receptores de Eph e as efrinas ativam vias de transdução de sinal através da ligação de vários tipos de proteínas citoplasmáticas que regulam a adesão e organização da actina no citoesqueleto (Poliakov, Cotrina e Wilkinson, 2004). A expressão do gene da Eph A3 encontra-se aumentada nos M $\phi$  tratados com CA. A Eph A3 pode ter papel importante na função linfóide (Surawska, Ma e Salgia, 2004). Assim, M $\phi$  com

expressão aumentada desse receptor podem apresentar uma melhor transdução de sinal.

CD1 pertence a um grande grupo de moléculas não clássicas que são estruturalmente relacionadas com as moléculas clássicas de apresentação de antígeno do MHC de classe I. Em camundongos, o CD1 é codificado por 2 genes, o CD1d1 and CD1d2 (Bradbury et al., 1988). Observou-se que o CA diminuiu a expressão do CD1d1. A deficiência de CD1d1 leva à diminuição drástica na produção de IL-4 (Mendiratta et al., 1997). A observação da diminuição na produção de IL-4 pelas células tratadas com CA deve-se provavelmente a diminuição da expressão do CD1d1.

#### **5.5.4. Proteínas relacionadas ao estresse: citoprotetores**

Macrófagos tratados com CA apresentam atividade aumentada tanto da enzima NAD(P)H oxidase quanto da iNOS, produzindo conseqüentemente ROS e NO (de Oliveira et al., 2006). Para proteger células e tecidos da toxicidade de radicais oxidativos, as células devem induzir a expressão de genes citoprotetores. Observou-se que o CA aumentou a expressão de genes que codificam proteínas normalmente expressas em condições de estresse como proteína “heat shock” Hsp70-1 (1A e 1B), metalotioneínas (MT-1 e MT-2), heme oxigenase-1 (HO-1), tioredoxina redutase (TR-3), “growth arrest and DNA-damage-inducible” 45 beta (GADD45 $\beta$ ), regulador de diferenciação eritróide (EDR) e sequestossoma (SQSTM1). Antioxidantes celulares parecem ser cruciais para diminuir o estresse oxidativo (Poss e Tonegawa, 1997).

Dos sistemas enzimáticos antioxidantes conhecidos, talvez os mais estudados são os que metabolizam diretamente os precursores dos radicais livres como as superóxidos dismutases, catalases e glutathionas peroxidases. Além dessas, as proteínas *heat shock* (HSP) também são altamente induzidas durante a resposta ao estresse (Poss e Tonegawa, 1997). As HSPs englobam um grande grupo de proteínas (Bachelet, Adric e Polls, 1998) que medeiam várias funções citoprotetoras e “housekeeping” agindo como imunoreguladoras (Pockely, 2003). O CA aumentou a expressão gênica da Hsp70 (1A e 1B). Sabe-se que a indução da Hsp70 em M $\phi$  é dependente da ativação da enzima NADPH oxidase e subseqüente geração de ROS



(Bachelet, Adric e Polls, 1998). Metalotioneínas (MT) e heme-oxigenase (HO) também estão envolvidas no sistema de defesa contra o estresse oxidativo (Takeda, Fujita e Shibahara, 1995). Observou-se que ambas isoformas (MT-1 e MT-2) estavam sendo expressas nos M $\phi$  tratados com CA. As MT recentemente foram descritas como tendo papel de “scavenger” (Sato e Bremner, 1993). A heme-oxigenase-1 (HO-1) e os seus produtos são conhecidos por mediar potentes efeitos antiinflamatórios em monócitos e/ou M $\phi$ , protegendo essas células do dano e modulando a iniciação da resposta imunitária (Otterbein et al., 2003). Observou-se o aumento da expressão do gene que codifica a HO-1 nas células tratadas com CA. Durante o estresse, a HO-1 é altamente induzida, e ela é considerada um dos indicadores mais confiáveis do estresse oxidativo celular (Poss e Tonegawa, 1997). Se M $\phi$  apresentam superexpressão da HO-1, a resposta proinflamatória (e.x. produção de TNF $\alpha$ ) é marcadamente inibida, enquanto que a resposta antiinflamatória (por exemplo, a produção de IL-10) é aumentada (Minamino et al., 2001).

Outras enzimas conhecidas por participarem na regulação redox são as tioredoxinas redutases (TR). É sabido que a sinalização redox é alcançada através da união de ROS com processos de óxido-redução. Três isozimas TR foram identificadas em humanos e camundongos (Sun et al., 1999). Observou-se o aumento da expressão do gene da TR-3. As TRs agem reciclando o sistema redox com resultado do aumento da sua expressão após remoção dos ROS pelas enzimas antioxidantes (Sun et al., 1999).

Proteínas GADD45-like medeiam as vias p38/JNK em resposta ao estresse do ambiente celular (Takekawa e Saito, 1998). O CA aumentou a expressão do GADD45 $\beta$  nos M $\phi$ . A JNK é crucial para induzir a morte celular programada iniciada por estímulo, e o mecanismo pelo qual o NF- $\kappa$ B protege as células é por diminuição da cascata JNK através da ativação transcricional da GADD45B (De Smaele et al., 2001). As duas vias, p38 e JNK, são implicados na regulação do ciclo celular. A parada temporária do ciclo celular pode promover a sobrevivência celular (Takekawa e Saito, 1998). O aumento transcricional de genes pró sobrevivência, como o GADD45 $\beta$ , é muito importante uma vez que o CA ativa M $\phi$ , induzindo a produção de muitos agentes citotóxicos, como NO por exemplo.

O regulador de diferenciação eritróide (EDR) é uma proteína liberada em diversas condições de estresse celular, muitas delas levando a uma resposta imunitária (Dörmer, Spitzer e Möller, 2004). O CA aumentou a expressão do EDR. Apesar da resposta ao peróxido de hidrogênio não ser suficiente para se assumir o papel primário de antioxidante do EDR (Dörmer, Spitzer e Möller, 2004; Adler et al., 1999), nesse trabalho podemos assumir que o EDR pode estar agindo como *scavenger*.

A formação do sequestossoma representa uma resposta de defesa removendo proteínas anormais de uma maneira inerte biologicamente, o qual pode ser eventualmente reutilizado pela célula após o término do estresse (Stumptner et al., 2002). O CA aumentou a expressão do gene do sequestossoma 1 (SQSTM1) nos M $\phi$ . SQSTM1 é codificado por uma resposta imediata ativada geneticamente por uma grande variedade de sinais extracelulares que envolvem proliferação e diferenciação celular, e particularmente, o estresse oxidativo (Stumptner et al., 2002; Ishii et al., 1999).

Como discutido anteriormente, ROS estão sendo produzidos pelos M $\phi$  tratados com CA. Sendo assim, muitas moléculas citoprotetoras estão sendo produzidas. Essas observações corroboram o conceito que o CA ativa o metabolismo oxidativo dos M $\phi$ , e conseqüentemente, participando na via de sinalização redox aumentando a expressão de genes citoprotetores.

#### **5.5.5. Enzimas**

A mevalonato cinase (MK) é uma enzima essencial na via do mevalonato, a qual produz vários isoprenóides celulares. Essa enzima faz parte de um grande grupo de compostos essenciais envolvidos em diversos processos celulares, incluindo transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, na tradução e glicosilação de proteínas, na proliferação e diferenciação celular (Houten, Wanders e Waterham, 2000). O CA aumentou a expressão gênica da MK. A deficiência na MK em doenças leva a desregulação do sistema imunitário, sendo assim, o aumento da expressão dessa enzima pode ter um importante significado biológico.

Aminopectidases catalisam a remoção seqüencial de aminoácidos da região N terminal de peptídeos e proteínas. A maioria das aminopectidases são

metaloenzimas. Além de função no metabolismo de peptídeos e proteínas, as aminopeptidases podem ter funções mais específicas. Essas incluem ativação e inativação de peptídeos biologicamente ativos, remoção de metionina de proteínas recém sintetizadas e, possivelmente, auxiliando a apresentação de antígenos pelo sistema MHC de classe I (Wilk, Wilk e Magnusson, 1998). O CA aumentou a expressão da aspartil aminopeptidase (Dnpep). A Dnpep tem papel importante no metabolismo de peptídeos e proteínas intracelulares. M $\phi$  ativados normalmente apresentam aumento nas funções de proteólise e peptidólise para acompanhar o aumento do processamento e apresentação de antígenos, regulando assim, o sistema imunitário. Além do processamento e apresentação de antígenos, a proteólise pode ser importante para a inativação de certas proteínas. A serina protease (Prss25) foi aumentada pelo CA, e ela também está envolvida na proteólise e peptidólise. A transcriptase reversa (RT) do vírus da imunodeficiência adquirida humana tipo 1 (HIV-1) tem papel central no ciclo replicativo do vírus. A degradação da HIV-1 RT pela interação direta com uma serino protease da célula hospedeira leva a uma infecção não produtiva (Château et al., 2001). Aumentando os níveis de serino-proteases em M $\phi$ , o CA pode aumentar a resposta imunitária contra viroses.

O CA também aumentou a expressão do gene da proteína ativadora gangliosídica G<sub>M2</sub> (Gm2a) em M $\phi$ . A G<sub>M2</sub> é requerida para a ativação da fosfolipase D (PLD). A PLD catalisa a hidrólise da fosfatidilcolina, gerando mediadores lipídicos utilizados no controle de vários processos patológicos e fisiológicos. Nesses se incluem o tráfego intracelular de proteínas, transporte vesicular, projeções citoplasmáticas, motilidade celular, mitogênese, oncogênese e inflamação (Nakamura et al., 1998). O aumento dessas funções pelo CA é essencial para uma melhor resposta imunitária.

Ácidos graxos e seus derivados influenciam uma grande variedade de processos celulares incluindo a síntese de fosfolipídios, fusão de vesículas, modificação e exportação de proteínas, ativação e desativação enzimática, sinalização celular, permeabilidade de membrana, patogênese bacteriana e controle transcricional (Black e DiRusso, 2003). A expressão gênica da enzima ácido graxo desaturase 1 (FADS1) foi aumentada pelo CA. Essa enzima regula a insaturação *de novo* de ácidos graxos introduzindo dupla ligação entre carbonos definidos na cadeia (Marquardt et al., 2000). Com o aumento da função dessa enzima, o CA

provavelmente está promovendo tanto a degradação quanto o acúmulo de ácidos graxos, ou seja, está interferindo no metabolismo dos ácidos graxos.

A expressão do gene da fosfatase de especificidade dupla (Dusp1) foi diminuída pelo CA. A Dusp1 é conhecida por inativar *in vitro* a proteína cinase ativadora “mitogen-activated” (MAP). O sistema MAP cinase 1,2/proteína cinase C é uma rede de sinalização intracelular que regula a maquinaria celular (Alessi, Smythe e Keyse, 1993). Sendo assim, diminuindo a expressão desse gene, o CA pode deixar a MAP cinase disponível para algum processo onde ela seja necessária.

As enzimas discutidas acima são essenciais no processo de ativação de M $\phi$ , uma vez que elas participam em vários processos relacionados desde a morfologia celular até reações bioquímicas.

#### **5.5.6. Receptores de quimiocinas e seus ligantes**

As quimiocinas fazem parte de uma família de citocinas pró-inflamatórias que atraem e ativam uma grande variedade de células. Duas famílias principais de quimiocinas foram identificadas, a CC e a CXC, baseando-se na posição dos dois primeiros resíduos de cisteína. Os efeitos das quimiocinas são mediados via interação dos receptores com proteínas G associadas (Mellado et al., 2001). A expressão dos genes da CC-quimiocina RANTES (CCL5) e dos receptores CCR2 e CXCR4 foi diminuída pelo CA.

Várias publicações da última década têm demonstrado a importância dos receptores de quimiocinas na entrada do vírus do HIV. Dois receptores de CC quimiocinas, CCR3 e CCR5, assim como o receptor da quimiocina CXCR4 têm se mostrado necessários na infecção pelo HIV-1 (Frade et al., 1997). O CCR5 e o CXCR4 agem sinergisticamente com o CD4 em um mecanismo multi passo que permite a ligação e a entrada do vírus HIV-1 (Singer et al., 2001). Outro receptor de CC quimiocina, CCR2, foi descrito como sendo co-receptor na infecção pelo HIV (Frade et al., 1997). A CC quimiocina RANTES (CCL5) pode aumentar a infecção pelo HIV nas células alvo de maneira dependente de CD4 e de co-receptores e até mesmo independente da rota de entrada do vírus. Ela auxilia a interligação de glicosaminoglicanas, como o heparan sulfato, no vírus e na membrana celular (Trkola et al., 1999). Receptores e ligantes diminuídos pelo CA podem interferir na

entrada do vírus e propagação da infecção através da redução da densidade de receptores e co-receptores disponíveis na superfície celular. Recentemente foi observado o aumento da qualidade de vida de pacientes HIV positivos, com o aumento das células CD4 positivas. Esse fato pode estar relacionado com a alteração da expressão das moléculas e receptores citados.

O CA, como foi demonstrado, aumenta as defesas antioxidantes. Os antioxidantes são conhecidos por diminuir a expressão do CCR2, CCR5 e CXCR4 (Saccani et al., 2000). Sendo assim, a diminuição dessas proteínas pode ser explicada pela regulação redox induzida pelo CA.

### **5.5.7. Outros receptores**

O receptor para formil peptídeo (Fpr) é um receptor acoplado a proteína G que medeia as respostas quimiotáticas fagocíticas, aumentando a migração celular e a liberação de mediadores pró-inflamatórios (Le, Oppenheim e Wang, 2001). O CA diminuiu a expressão do gene relacionado com a sequência 2 do Fpr (Fpr-rs2) apesar de seu papel na resposta imunitária. A Fpr-rs2 de murinos é estruturalmente e funcionalmente similar a humana FPRL1 (Hartt et al. 1999). Agonistas tanto para o FPR quanto para o FPRL1 foram descritos. A anexina I e o envelope protéico do HIV-1 contém domínios que interagem com receptores FPR (Le, Oppenheim e Wang, 2001). Observou-se que a expressão da anexina A1 foi diminuída pelo CA. A anexina I é utilizada por fagócitos como receptor para o reconhecimento de células apoptóticas (Fan et al., 2004).

O receptor com estrutura semelhante ao colágeno (MARCO) pertence à classe A de receptores *scavenger* de moléculas. Ele possui como característica a possibilidade de ligação com várias moléculas diferentes incluindo componentes da superfície celular de bactéria. O receptor MARCO pode formar um sistema de backup através do qual o organismo pode armar rapidamente mais células com receptores para fagocitose mais eficientes (Kraal et al., 2000). O CA diminuiu a expressão gênica do receptor MARCO em Mφ.

Como a diminuição desses receptores, que estão diretamente envolvidos na resposta imunitária, influencia os efeitos imunomodulatórios do CA é ainda

desconhecido. Sendo assim mais trabalhos devem ser realizados para tentar elucidar suas funções e atuações nas células tratadas.

#### **5.5.8. Genes induzidos por IFN**

Interferons são citocinas que possuem efeitos antivirais e inibem a proliferação de células tumorais. Eles induzem um grande número de genes em suas células alvo. Apesar de não ter sido encontrada alterações na produção de IFN- $\gamma$  nas células tratadas com CA, observou-se à diminuição da expressão de genes regulados pelo interferon. Esses foram os genes ativados por interferon 205 e 202A, proteína induzível por interferon gama, proteína 1 induzível por interferon, GTPase induzível por interferon gama, e as proteínas 1 e 2 ligadoras de guanilato. Essas mudanças ocorrem por motivos ainda desconhecidos e também necessitam de mais estudos.

## 6. CONCLUSÃO

As pesquisas realizadas durante o doutorado permitiram concluir que o tratamento com o Canova:

- aumenta a atividade da enzima NAD(P)H oxidase;
- quantitativamente não altera a produção de  $H_2O_2$ ;
- diminui a produção de  $O_2^-$ ;
- aumenta a atividade da enzima iNOS;
- aumenta a produção de NO;
- aumenta a quantidade de vesículas ácidas no citoplasma dos M $\phi$ ;
- diminui a expressão do CD74(li);
- diminui a produção da IL-2 e IL-4 após tratamento *in vivo*;
- altera o perfil da expressão gênica.

A partir das análises aqui apresentadas podemos concluir que o CA provoca reações celulares que envolvem desde ativação da produção de determinadas moléculas até alterações no perfil de expressão de genes relacionados com a ativação de macrófagos. Sendo assim, foi possível propor algumas explicações de como o CA aumenta as funções imunitárias do organismo, através de sua atuação em M $\phi$ , podendo ser considerado um modificador de resposta biológica.

## 7. BIBLIOGRAFIA

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**, 4<sup>th</sup> edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 553pg, 2000.

ABUD, A.P.R.; CESAR, B.; CAVAZZANI, L.F.M.; De OLIVEIRA, C.C.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Activation of bone marrow cells treated with Canova *in vitro*. **Cell Biology international**, vol. 30(10), p. 808-816, 2006.

ADLER, V.; YIN, Z.; TEW, K.D.; RONAI, Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. **Oncogene**, vol. 18(45), p. 6104-6111, 1999.

ALESSI, D.R.; SMYTHE, C.; KEYSE, S.M. The human CL100 gene encodes a tyr/thr-protein phosphatase which potently and specifically inactivates MAP kinase and suppresses its activation by oncogenic ras in *Xenopus* oocyte extracts. **Oncogene**, vol. 8, p. 2015-2020, 1993.

ALONSO-MAGDALENA, P.; ARGUELLES, J.; JIMENEZ, N.C.; GONZALEZ-PARDO, H.; PERILLAN, C.; COSTALES, M.; VIJANDE, M. Quantitative histochemical assessment of oxidative metabolism in the subfornical organ after partial aortic ligation in rats. **Neuroscience Letters**, vol. 344, p. 49-52, 2003.

BABIOR, B. Phagocytes and Oxidative Stress. **The American Journal of Medicine**, vol. 109, p. 33-44, 2000.

BACHELET, M.; ADRIC, C.; POLLS, B.S. Macrophages and heat shock proteins. **Research in Immunology**, vol. 149(7-8), p. 727-732, 1998.

BADVE, S.; DESHPANDE, C.; HUA, Z.; LOGDBERG, L. Expression of invariant chain (CD 74) and major histocompatibility complex (MHC) class II antigens in the human fetus. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, vol. 50(4), p. 473-82, 2002.

BALLOW, M.; NELSON, R. Immunopharmacology: immunomodulation and immunotherapy. **The Journal of the American Medical Association**, vol. 278(22), p. 2008-2017, 1997.

BLACK, P.N.; DIRUSSO, C.C. Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: proteins, enzymes and vectorial esterification. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vol. 67(3), p. 454-472, 2003.

BLOCKER, A.; SEVERIN, F.F.; BURKHARDT, J.K.; BINGHAM, J.B.; YU, H.; OLIVO, J.C.; SCHROER, T.A.; HYMAN, A.A.; GRIFFITHS, G. Molecular



requirements for bi-directional movement of phagosomes along microtubules. **Journal of Cell Biology**, vol. 137(1), p. 113-129, 1997.

BRADBURY, A.; BELT, K.T.; NERI, T.M.; MILSTEIN, C.; CALABI, F. Mouse CD1 is distinct from and co-exists with TL in the same thymus. **The EMBO Journal**, vol. 7(10), p. 3081-3086, 1988.

BRAKEBUSCH, C.; FÄSSLER, R. The integrin-actin connection, an eternal love affair. **The EMBO Journal**, vol. 22(10), p. 2324-2333, 2003.

BRIGGS, R.T.; DRATH, D.B.; KARNOVSKY, M.L.; KARNOVSKY, M.J. Localization of NADH oxidase on the surface of human polymorphonuclear leukocytes by a new cytochemical method. **The Journal of Cell Biology**, vol. 67, p. 566-586, 1975.

BOND U, JAMES T. Dynamic changes in small nuclear ribonucleoproteins of heat-stressed and thermotolerant HeLa cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, vol. 32, p. 643-656, 2000.

CHAN, Y.L.; OLVERA, J.; WOOL, I.G. The primary structure of rat ribosomal protein S28. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 179(1), p. 314-318, 1991.

CHÂTEAU, M.T.; ROBERT-HEBMANN, V.; DEVAUX, C.; LAZARO, J.B.; CANARD, B.; COUX, O. Human monocytes possess a serine protease activity capable of degrading HIV-1 reverse transcriptase *in vitro*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 285(4), p. 863-872, 2001.

COTE-SIERRA, J.; FOUCRAS, G.; GUO, L.; CHIODETTI, L.; YOUNG, H.A.; HU-LI, J.; ZHU, J.; PAUL, W.E. Interleukin 2 plays a central role in TH2 differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 101(11), p. 3880-3885, 2004.

DARLEY-USMAR, V.; WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. **FEBS Letters**, vol. 369, p. 131-135, 1995.

DARZYNKIEWICZ, Z. Simultaneous analysis of cellular RNA and DNA content. **Methods in Cell Biology**, vol. 41, p. 401-420, 1994.

De OLIVEIRA, C.C.; OLIVEIRA, S.M.; GODOY, L.M.F.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **Journal of Infection**, vol. 52(6), p. 420-432, 2006.

De RISI, J.L.; IYER, V.R.; BROWN, P.O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. **Science**, vol. 278, p. 680-686; 1997.

De SMAELE, E.; ZAZZERONI, F.; PAPA, S.; NGUYEN, D.U.; JIN, R.; JONES, J.; CONG, R.; FRANZOSO, G. Induction of gadd45-beta by NF-kappa-B down regulates pro-apoptotic JNK signaling. **Nature**, vol. 414(6861), p. 308-313, 2001.

DESJARDINS, M.; HUBER, L.A.; PARTON, R.G.; GRIFFITHS, G. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. **Journal of Cell Biology**, vol. 124(5), p. 677-688, 1994.

Di BERNARDI, R.P. **Recuperação de pacientes HIV/AIDS em Botswana, África, com uso do medicamento homeopático Canova**. Curitiba, 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Universidade Federal do Paraná.

DÖRMER, P.; SPITZER, E.; MÖLLER, E.D.R is a stress-related survival factor from stroma and other tissues acting on early haematopoietic progenitors (E-Mix). **Cytokine**, vol. 27(2-3), p. 47-57, 2004.

FAN, X.; KRAHLING, S.; SMITH, D.; WILLIAMSON, P.; SCHLEGEL, R.A. Macrophage surface expression of annexins I and II in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes. **Molecular Biology of the Cell**, vol. 15, p. 2863-2872, 2004.

FISHER, P. How does homeopathy work: are we looking in the right place? **Homeopathy**, vol. 92, p. 1-2, 2003.

FORMAN, H.J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Molecular Aspects of Medicine**, vol. 22, p.189-216, 2001.

FRADE, J.M.R.; LIORENTE, M.; MELLADO, M.; ALCAMI, J.; RAMOS-GUTIÉRREZ, J.C.; ZABALLOS, A.; DEL REAL, G.; MARTINEZ-A, C. The amino-terminal domain of the CCR2 chemokine receptor acts as coreceptor for HIV-1 infection. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 100(3), p. 497-502, 1997.

GOERDT, S.; ORFANOS, C.E. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. **Immunity**, vol. 10, p. 137-142, 1999.

GODOY, L. **Efeitos do medicamento Método Canova® sobre a funcionalidade de macrófagos**. Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Universidade Federal do Paraná.

GORDON, S. Macrophages and the immune response. **Fundamental Immunology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 533-545, 1999.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, vol. 3, p. 23-35, 2003.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]-nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, vol. 126, p. 131-138, 1982.

HAN, Y.J.; KWON, Y.G.; CHUNG, H.T.; LEE, S.K.; SIMMONS, R.L.; BILLIAR, T.R.; KIM, Y.M. Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF- $\kappa$ B activation: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. **Nitric oxide: Biology and Chemistry**, vol. 5 (5), p. 504-513, 2001.

HARTT, J.K.; BARISH, G.; MURPHY, P.M.; GAO, J.L. *N*-formylpeptides induce two distinct concentration optima for mouse neutrophil chemotaxis by differential interaction with two *N*-formylpeptide receptor (FPR) subtypes: molecular characterization of FPR2, a second mouse neutrophil FPR. **The Journal of Experimental Medicine**, vol. 190(5), p. 741–747, 1999.

HUME, D.A. The mononuclear phagocyte system. **Current Opinion in Immunology**, vol. 18, p. 49-53, 2006.

HYNES RO. Integrin: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, vol. 69(1), p. 11-25, 1992.

HOUTEN, S.M.; WANDERS, R.J.A.; WATERHAM, H.R. Biochemical and genetic aspects of mevalonate kinase and its deficiency. **Biochimica et Biophysica Acta: Molecular and Cell Biology of Lipids**, vol. 1529(1-3), p. 19-32, 2000.

IRIZARRY, R.A.; BOLSTAD, B.M.; COLLIN, F.; COPE, L.M.; HOBBS, B.; SPEED, T.P. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. **Nucleic Acids Research**, vol. 31(4), p. e15, 2003.

ISHIGAMI, S.; NATSUGOE, S.; TOKUDA, K.; NAKAJO, A.; IWASHIGE, H.; ARIDOME, K.; HOKITA, S.; AIKOU, T. Invariant chain expression in gastric cancer. **Cancer Letters**, vol. 168(1), p. 87-91, 2001.

ISHII, T.; ITOH, K.; SATO, H.; BANNAI, S. Oxidative stress-inducible proteins in macrophages. **Free Radical Research**, vol. 31, p. 351-355, 1999.

JAHRAUS, A.; STORRIE, B.; GRIFFITHS, G.; DESJARDINS, M. Evidence for retrograde traffic between terminal lysosomes and the prelysosomal / late endosome compartment. **Journal of Cell Science**, vol. 107(1), p. 145-157, 1994.

JOHNSTON, R.B.; GODZIK, C.A.; COHN, Z.A. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 148, p. 115-127, 1978.

JONAS, W.; KAPTCHUK, T.J.; LINDE, K. A critical overview of homeopathy. **Annals of Internal Medicine**, vol. 138, p. 393-399, 2003.

JONAS, W.B.; JACOBS, J. **A cura através da homeopatia**, Rio de Janeiro, editora Campus, 1996.

JONES, R.D.; HANCOCK, J.T.; MORICE, A.H. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 29 (5), p. 416-424, 2000.

KAMBACH, C.; WALKE, S.; NAGAI, K. Structure and assembly of the spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles. **Current Opinion in Structural Biology**, vol. 9(2), p. 222-230, 1999.

KLIMP, A.H.; DE VRIES, E.G.E.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEM, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer, **Critical Reviews in Oncology/hematology**, vol. 44, p. 183-161, 2002.

KRAAL, G.; VAN DER LAAN, L.J.W.; ELOMAA, O.; TRYGGVASON, K. The macrophage receptor MARCO. **Microbes and Infection**, vol. 2(3), p. 313-316, 2000.

KRAUZE-BARANOWSKA, M.; CISOWSKI, W. Flavone c-glycosides from *Bryonia alba* and *B. dioica*. **Phytochemistry**, vol. 39(3), p. 727-729, 1995.

KUBO, M.; HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. **Nature Immunology**, vol. 4(12), p. 1169-1176, 2003.

LE, Y.; OPPENHEIM, J.J.; WANG, J.M. Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. **Cytokine Growth Factor Reviews**, vol. 12(1), p. 91-105, 2001.

LI, N.; KARIN, M. Is NF- $\kappa$ B the sensor of oxidative stress? **The FASEB Journal**, vol. 13, p. 1137-1143, 1999.

LIEW, F.Y.; WEI, X.; PROUDFOOT, L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. **Philosophical Transactions: Biological Sciences**, vol. 352, p. 1311-1315, 1997.

LINARES, E.; GIORGIO, S.; MORTARA, R.A.; SANTOS, C.X.C.; YAMADA, A.T.; AUGUSTO, O. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 30(11), p. 1234-1242, 2001.

LOPES, L. **Efeitos do medicamento homeopático Canova no sistema endossomal/lisossomal e corpos lipídicos de macrófagos**. Curitiba, 2004. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal do Paraná.

LOPES, L.; GODOY, L.M.F.; DE OLIVEIRA, C.C.; GABARDO, J.; SCHADECK, R.J.G.; BUCHI, D.F. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by *Canova* medication. **Micron**, vol. 37, p. 277-287, 2006.

MARQUARDT, A.; STOHR, H.; WHITE, K.; WEBER, B.H.F. cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. **Genomics**, vol. 66(2), p. 175-183, 2000.

MARSH, J. A., KENDALL, M. D. **The physiology of immunity**. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1996.

MATHIE, R.T. The research evidence base for homeopathy: a fresh assessment of the literature. **Homeopathy**, vol. 92, p. 84-91, 2003.

MELLADO, M.; FRADE, J.M.R.; VILA-CORO, A.J.; FERNÁNDEZ, S.; DE ANA, A.M.; JONES, D.R.; TORÁN, J.L.; MARTINEZ-A, C. Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. **The EMBO Journal**, vol. 20(10), p. 2497-2507, 2001.

MENDIRATTA, S.K.; MARTIN, W.D.; HONG, S.; BOESTEANU, A.; JOYCE, S.; VAN KAER, L. CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. **Immunity**, vol. 6, p. 469-477, 1997.

MINAMINO, T.; CHRISTOU, H.; HSIEH, C.M.; LIU, Y.; DHAWAN, V.; ABRAHAM, N.G.; PERRELLA, M.A.; MITSIALIS, S.A.; KOUREMBANAS, S. Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 98(15), p. 8798-8803, 2001.

MITRA, K.; KUNDU, S.N.; KHUDA BUKHSH, A.R. Efficacy of a potentized homoeopathic drug (Arsenicum Album-30) in reducing toxic effects produced by arsenic trioxide in mice: I. On rate of accumulation of arsenic in certain vital organs. **Complementary Therapies in Medicine**, vol. 6, p. 178-184, 1998.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 73, p. 209-212, 2003.

MURAKAMI, K.; TRABER, D.L., Pathophysiological basis of smoke inhalation injury. **News in Physiological Sciences**, vol. 18, p.125-129, 2003.

MURPHY, M.P.; PACKER, M.A.; SCARLETT, J.L.; MARTIN, S.W. Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. **General Pharmacology**, vol. 31(2), p. 179-186, 1998.

NAIRN, R.C., ROLLAND, J.M. Fluorescent probes to detect lymphocyte activation. **Clin. Exp. Immunol.** vol. 39, p. 1-13, 1980.

NAKAMURA, S.I.; AKISUE, T.; JINNAI, H.; HITOMI, T.; SARKAR, S.; MIWA, N.; OKADA, T.; YOSHIDA, K.; KURODA, S.I.; KIKKAWA, U.; NISHIZUKA, Y. Requirement of G<sub>M2</sub> ganglioside activator for phospholipase D activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 95(21), p. 12249-12253, 1998.

NASER, B.; BODINET, C.; TEGTMEIR, M.; LINDEQUIST, U. *Thuja occidentalis* (Arbor vitae): A review of its pharmaceutical, pharmacological and clinical properties. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, vol. 2(1), p. 69-78, 2005.

NATHAN, C.; SHILOH, M.U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 97 (16), p. 8841-8848, 2000.

NAYAL, A.; WEBB, D.J.; HORWITZ, A.F. Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics. **Current Opinion in Cell Biology**, vol. 16(1), p. 94-98, 2004.

NORTH, R.J. The concept of the activated macrophage. **The Journal of Immunology**, vol. 121(3), p. 806-809, 1978.

NYGREN, H.; BROBERG, M.; ERIKSSON, C.; SAHLIN, H.; YAHYAPOUR, N. The respiratory burst response of surface-adhering leukocytes. A key to tissue engineering. **Colloids and Surfaces**, vol. 22, p. 87-97, 2001.

OHMORI, Y.; HAMILTON, T.A. Regulation of macrophage gene expression by T-cell-derived lymphokines. **Pharmacology & Therapeutics**, vol. 63, p. 235-264, 1994.

OLIVEIRA, C.C. **Detecção de produtos reativos intermediários de oxigênio em macrófagos tratados com o medicamento homeopático Método Canova®.**

Curitiba, 2002. Monografia de conclusão de curso (Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná.

OTTERBEIN, L.E.; SOARES, M.P.; YAMASHITA, K.; BACH, F.H. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. **TRENDS in Immunology**, vol. 24(8), p. 449-455, 2003.

PAKIANATHAN, D.R.; KUHN, R.E. *Trypanosoma cruzi* affects nitric oxide production by murine peritoneal macrophages. **Journal of Parasitology**, vol. 80 (3), p. 432-437, 1994.

PARKIN, J.; COHEN, B.; Overview of the immune system, **The Lancet**, vol. 357, 2001.

PEDALINO, C.M.V.; PERAZZO, F.F.; CARVALHO, J.C.T.; MARTINHO, K.S.; MASSOCO, C.; BONAMIM, L.V. Effect of *Atropa belladonna* and *Echinacea angustifolia* in homeopathic dilution on experimental peritonitis. **Homeopathy**, vol. 93, p. 193-198, 2004.

PEREIRA, W.K.V.; LONARDONIB, M.V.C.; GRESPANA, R.; CAPARROZ-ASSEFA, S.M.; CUMANA, R.K.N.; BERSANI-AMADOA, C.A.J. Immunomodulatory effect of *Canova* medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. **Journal of Infection**, vol. 51, p. 157-164, 2005.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological Methods**, vol. 38, p. 161-170, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, vol. 46, p. 211-226, 1981.

PIEMONTE, M.R.; BUCHI, D.F. Analysis of IL-2, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production,  $\alpha_5\beta_1$  integrins and actin filaments distribution in intraperitoneal mouse macrophages treated with homeopathic medicament. **Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology**, vol. 3, p. 255-263, 2002.

PIETERS, J. MHC class II restricted antigen presentation. **Current Opinion in Immunology**, vol. 9, p. 89-96, 1997.

PLAYFAIR, J. **Infection and Immunity**. Oxford University Press Inc., New York, 1995.

POCKLEY G. Heat shock proteins as regulators of the immune response. **The Lancet**, vol. 362(9382), p. 469-476, 2003.

POLIAKOV, A.; COTRINA, M.; WILKINSON, D. Diverse roles of Eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. **Developmental Cell**, vol. 7(4), p. 465-480, 2004.

POSS, K.D.; TONEGAWA, S. Reduced stress in heme-oxygenase 1-deficient cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 94(20), p. 10925-10930, 1997.

RABINOWITZ, S.; HORSTMANN, H.; GORDON, S.; GRIFFITHS, G. Immunocytochemical characterization of the endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal macrophages. **Journal of Cell Biology**, vol. 116(1), p. 95-112, 1992.

RAMAKRISHNAN V. Ribosome structure and the mechanism of translation. **Cell**, vol. 108, p. 557-572, 2002.

RAWLINGSON, A. Nitric oxide, inflammation and acute burn injury. **Burns**, vol. 29, pp. 631-640; 2003.

REES RC. Cytokines as biological response modifiers. **Journal of Clinical Pathology**, vol. 45(2), p. 93-98, 1992.

ROITT, I, BROSTOFF, J., MALE, D. **Imunologia**. Editora Manole Ltda., 5<sup>a</sup> ed., São Paulo, 423pg; 1999.

RUIZ, R. **A montagem da teoria da dinamização dos medicamentos homeopáticos de Samuel Hanemann**, São Paulo, 1999. Tese de doutorado – Pontifícia Universidade Católica de São Paulo.

SACCANI, A.; SACCANI, S.; ORLANDO, S.; SIRONI, M.; BERNASCONI, S.; GHEZZI, P.; MANTOVANI, A.; SICA, A. Redox regulation of chemokine receptor expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 97(4), p. 2761-2766, 2000.

SASAKI, M.G.M, MARIANO, F.C.; GURGEL, L.; PROBST, S. Estudo clínico randomizado placebo controlado para avaliar a eficácia e segurança do Método Canova na terapêutica de pacientes portadores de HIV/AIDS em uso de anti-retrovirais. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, vol. 5 (supplement 1), p.58, 2001.



SATO, M.; BREMNER, I. Oxygen free radicals and metallothionein. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 14(3), p. 325-337, 1993.

SATO, D.Y.O.; WAL, R.; DE OLIVEIRA, C.C.; CATTANEO, R.I.I.; MALVEZZI, M. GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. **Homeopathy**, vol. 94, p.26-32, 2005.

SBARBA, P.D.; NENCIONI, L.; LABARDI, D.; ROVIDA, E.; CACIAGLI, B.; CIPOLLESCHI, M.G. Interleukin 2 down-modulates the macrophage colony-stimulating factor receptor in murine macrophages. **Cytokine**, vol. 8(6), p. 488-494, 1996.

SEABRA, S.H.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R.A. *Toxoplasma gondii* partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages. **Experimental Parasitology**, vol. 100, p. 62-70, 2002.

SEGAL, A. W.; ABO, A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **Trends in Biochemical Sciences**, vol. 18, p. 43-47, 1993.

SELIGMANN, I.C.; LIMA, P.D.L.; CARDOSO, P.C.S.; KHAYAT, A.S.; BAHIA, M.O.; BUCHI, D.F.; CABRAL, I.R.; BURBANO, R. The anticancer homeopathic composite “*Canova Method*” is not genotoxic for human lymphocytes in vitro. **Genetics and Molecular Research**, vol. 2 (2), p. 223-228, 2003.

SINGER, I.I.; SCOTT, S.; KAWKA, D.W.; CHIN, J.; DAUGHERTY, B.L.; DEMARTINO, J.A.; DISALVO, J.; GOULD, S.L.; LINEBERGER, J.E.; MALKOWITZ, L.; MILLER, M.D.; MITNAUL, L.; SICILIANO, S.J.; STARUCH, M.J.; WILLIAMS, H.R.; ZWEERINK, H.J.; SPRINGER, M.S. CCR5, CXCR4, and CD4 are clustered and closely apposed on microvilli of human macrophages and T cells. **Journal of Virology**, vol. 75(8), p. 3779-3790, 2001.

SÖDERSTRÖM, K.O. A simple technique for the phase contrast and acridine orange fluorescence microscopy of the same living cells. **Journal of Microscopy**, Vol.109, p. 253-255, 1977.

STADLER, B.M.; WECK, A.L. Cytofluorometric analysis of macrophages activated *in vivo* or *in vitro*. **European Journal of Immunology**, vol. 8, p.243-246, 1978.

STRAUBE, A.; ENARD, W.; BERNER, A.; WEDLICH-SÖLDNER, R.; KAHMANN, R.; STEINBERG, G. A split motor domain in a cytoplasmic dynein. **The EMBO Journal**, vol. 20(18), p. 5091-5100, 2001.

STROPARO, E. **Pacientes HIV/AIDS+ tratados com o medicamento homeopático Canova – estudo prospectivo observacional em índices laboratoriais, clínicos e de qualidade de vida**. Curitiba, 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Universidade Federal do Paraná.

STUMPTNER, C.; FUCHSBICHLER, A.; HEID, H.; ZATLOUKAL, K.; DENK, H. Mallory body – a disease-associated type of sequestosome. **Hepatology**, vol. 35(5), p. 1053-1062, 2002.

SUN, Q.A.; WU, Y.; ZAPPACOSTA, F.; JEANG, K.T.; LEE, B.J.; HATFIELD, D.L.; GLADYSHEV, V.N. Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductase. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 274(35), p. 24522-24530, 1999.

SURAWSKA, H.; MA, P.C.; SALGIA, R. The role of ephrins and Eph receptors in cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, vol. 15(6), p. 419-433, 2004.

SZABÓ, C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. **Toxicology Letters**, vol. 140/141, p. 105-112, 2003.

TAKEDA, K.; FUJITA, H.; SHIBAHARA, S. Differential control of the metal-mediated action of the human heme oxygenase-1 and metallothionein IIa genes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 207(1), p. 160-167, 1995.

TAKEKAWA, M.; SAITO, H. A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. **Cell**, vol. 95(4), p. 521-530, 1998.

TANACKOVIC G, KRÄMER A. Human splicing factor SF3a, but not SF1, is essential for pre-mRNA splicing *in vivo*. **Molecular Biology of the Cell**, vol. 16, p. 1366-1377, 2005.

TARPEY, M.M.; FRIDOVICH, I. Methods of detection of vascular reactive species: Nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. **Circulation Research**, vol. 89 (3), p. 224-236, 2001.

TRKOLA, A.; GORDON, C.; MATTHEWS, J.; MAXWELL, E.; KETAS, T.; CZAPLEWSKI, L.; PROUDFOOT, A.E.I.; MOORE, J. The CC-chemokine RANTES

increases the attachment of human immunodeficiency virus type 1 to target cells via glycosaminoglycans and also activates a signal transduction pathway that enhances viral infectivity. **Journal of Virology**, vol. 73(8), p. 6370-6379, 1999.

TUSHER, V.G.; TIBSHIRANI, R.; CHU, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 98(9), p. 5116-5121, 2001.

TSUNAWAKI, S.; NATHAN, C.F. Enzymatic basis of macrophage activation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 259 (7), p. 4305-4312, 1984.

UNANUE, E.R.; ALLEN, P.M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. **Science**, vol. 236, p. 551-557, 1987.

VAUGHAN, K.T.; MIKAMI, A.; PASCHAL, B.M.; HOLZBAUR, E.L.F.; HUGHES, S.M.; ECHEVERRI, C.J.; MOORE, K.J.; GILBERT, D.J.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A.; VALLEE, R.B. Multiple mouse chromosomal loci for dynein-based motility. **Genomics**, vol. 36(1), p. 29-38, 1996.

VICKERS, A.; ZOLLMAN, C. ABC of complementary medicine: Homoeopathy. **British Medical Journal**, vol. 519, p. 1115-1118, 1999.

VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. 5<sup>a</sup> ed, Ed. Campos, Rio de Janeiro, 1980.

VIRÁG, L.; SZABÓ, E.; GERGELY, P.; SZABÓ, C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. **Toxicology letters**, vol. 40-141, p. 113-124, 2003.

WALACH, H.; KÖSTER, H.; HENNIG, T.; HAAG, G. The effects of homeopathic belladonna 30 CH in healthy volunteers – a randomized, double blind experiment. **Journal of Psychosomatic Research**, vol. 50, p. 155-160, 2001.

WANG, Y.; XU, M.; CHE, M.; VON HOFER, E.; ABBAS, A.; KALLINTERIS, N.L.; LU, X.; LISS, Z.J.; FORMAN, J.D.; HILLMAN, G.G. Curative antitumor immune response is optimal with tumor irradiation followed by genetic induction of major histocompatibility complex class I and class II molecules and suppression of li protein. **Human Gene Therapy**, vol. 16(2), p. 187-99, 2005.

WIDAKOWICH, J. Pharmacodynamic principles of homeopathy. **Medical Hypotheses**, vol. 54, issue 5, p. 721-72, 2000.

WILK S, WILK E, MAGNUSSON RP. Purification, characterization and cloning of a cytosolic aspartyl aminopeptidase. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 273(26), p. 15961-15970, 1998.

WINK, D.A.; MITCHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 25 (4/5), p. 434-456, 1998.

WOOD, K.J., AUSTYN, J.M. **Principles of cellular and molecular immunology**. Oxford University Press Inc, New York, 1993.

WOODS, A.; COUCHMAN, J.R. Syndecan-4 and focal adhesion function. **Current Opinion in Cell Biology**, vol. 13(5), p. 578-583, 2001.

XIA, Y., ZWEIER, J.L. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 94, p. 6954-6958, 1997.

YUN, P.L.W.; DECARLO, A.A.; HUNTER, N. Modulation of major histocompatibility complex protein expression by human gamma interferon mediated by cysteine proteinase-adhesion polyproteins of *Porphyromonas gingivalis*. **Infection and Immunity**, vol. 67(6), p. 2986-2995, 1999.

ZHOU, Y.; LIN, G.; MURTAUGH, M.P. Interleukin-4 suppresses the expression of macrophage NADH oxidase heavy chain subunit (gp91-phox). **Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research**, vol. 1265(1), p. 40-48, 1995.

# ANEXOS

## **ANEXO 1 – ANIMAIS E TRATAMENTO**

### **Animais:**

⇒ Camundongos (*Mus musculus*) albinos suíços, de aproximadamente 3 meses de idade, pesando entre 25-30 g (cedidos pelo biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR);

⇒ O número de animais utilizados por grupo em cada experimento deverá ser determinado dependendo do número de células necessárias em cada experimento;

⇒ Todas as recomendações da lei nacional (nº 6638, 5 de novembro de 1979) para manuseio de animais devem ser respeitada.

### **Tratamento:**

⇒ Ensaios *in vivo* – animais tratados durante sete dias. O número de animais tratados por grupo depende do número de células necessárias em cada experimento. Porém em sua grande maioria foram utilizados 5 animais por grupos. Utilizar os seguintes grupos:

- grupo tratado com Canova (CA): administrar injeções subcutâneas de 7 µl/g de Canova a cada 24 horas; OBS: o Canova deve ser sucussionado antes de cada aplicação;

- grupo tratado com solução hidro-alcoólica (H): administrar injeções subcutâneas de 7 µl/g de solução hidro-alcoólica estéril (água destilada mais 0,01% de álcool neutro) a cada 24 horas;

- grupo tratado com solução hidro-alcoólica sucussionada (Hs): administrar injeções subcutâneas de 7 µl/g de solução hidro-alcoólica sucussionada estéril (água destilada mais 0,01% de álcool neutro) a cada 24 horas;

- grupo controle ou normal (N): não administrar nenhuma substância nestes animais.

⇒ Ensaios *in vitro* – em cultura de macrófagos peritoneais coletados a partir de camundongos normais não tratados, após 2 horas de cultivo, adicionar 10% da solução pesquisada em relação à quantidade de meio. Passadas mais 24 horas, adicionar dose reforço de 1% das soluções.

## **ANEXO 2 – PREPARO DO CULTIVO CELULAR**

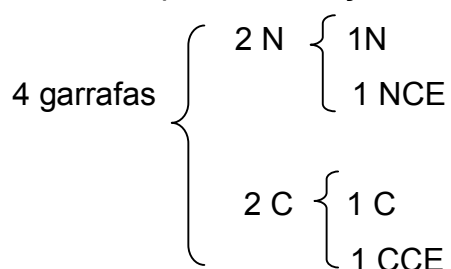
- ⇒ Coletar as células da cavidade peritoneal de camundongos com 10 ml de “Phosphate Buffer Solution” (PBS) ou “Hank’s Buffer Salt Solution” (HBSS) a 4°C,
- ⇒ Contar as células em câmara de Neubauer,
- ⇒ Em ambiente estéril, adicionar as células em garrafas ou placas de cultivo,
- ⇒ Incubar as células por quinze minutos a 37°C 5% de CO<sub>2</sub> para a adesão, OBS: após esse período, apenas macrófagos ficam aderidos.
- ⇒ Lavar as células com PBS a 37 °C e adicionar meio de cultura “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal contendo penicilina 1 U/ml, estreptomicina 1 µg/ml, e anfotericina 2,5 µg/l,
- ⇒ Levar a estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C pelo tempo determinado de cultura (24 ou 48 horas).

**ANEXO 3 – CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL PARA NAD(P)H OXIDASE**  
**segundo Briggs et al., 1975**

⇒ Cultivar as células em garrafas de cultivo de 25 cm<sup>3</sup> (5 x 10<sup>6</sup> células por garrafa), OBS: caso o tratamento seja *in vivo* adicionar as células e deixar aderir por 15 minutos em estufa 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

⇒ Lavar o meio de cultivo das células com tampão Tris Maleato 0,1M pH 7,5 contendo 7% de sacarose a 4°C

⇒ Dividir em grupos de controle do tratamento (N) e tratado com Canova (C). Os grupos foram ainda subdivididos para a utilização do controle da enzima (CE).



**Organograma mostrando a divisão dos grupos.** Onde: N – grupo normal; C – Canova ; CE – grupo controle da enzima com 3-amino-1, 2,4 triazol (AT), inibidor da catalase celular, e sem NAD(P)H (substrato da enzima).

⇒ Pré-incubar em solução contendo tampão Tris Maleato 0,1M, pH 7,5 com 7% de sacarose e 1 mM de AT durante 10 minutos. Desprezar,

⇒ Lavar com tampão Tris Maleato 0,1M, pH 7,5 com 7% de sacarose,

⇒ Incubar durante vinte minutos à 37°C. Os grupos N e C incubar em solução contendo tampão Tris Maleato 0,1M, pH 7,5 com 7% de sacarose, 10 mM de AT, 1 mM CeCl<sub>3</sub>, 0,71 mM de NAD(P)H. O grupo CE incubar em solução contendo tampão Tris Maleato 0,1M, pH 7,5 com 7% de sacarose, 10 mM de AT, 1 mM CeCL<sub>3</sub>, sem a adição de NAD(P)H,

⇒ Lavar duas vezes com tampão Tris Maleato 0,1M, pH 7,5 com 7% de sacarose,

⇒ Fixar as células

⇒ Processar para microscopia eletrônica de transmissão (MET)

OBS: na pós-fixação de células onde foi efetuado o processamento para NAD(P)H oxidase, não utilizar ferrocianeto de potássio. Observar o material sem contrastação.



#### **ANEXO 4 – DETECÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ( $H_2O_2$ )**

##### **segundo Pick e Mizel, 1981**

⇒ Cultivar em placas de 96 poços ( $3-5 \times 10^5$  células/poço) pelo tempo determinado, OBS: caso o tratamento seja *in vivo* adicionar as células e deixar aderir por 15 minutos em estufa  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ .

⇒ Lavar o meio de cultivo com “Hank’s Buffered Salt Solution” (HBSS) a  $37^\circ\text{C}$ ,

⇒ Adicionar meio de reação (MR) contendo vermelho de fenol a 1M e 15 U/ml de peroxidase (HRPO tipo VI-A, 1310U/ml – Sigma) dissolvidos em HBSS (com ou sem drogas testadas),

⇒ Como controle positivo adicionar ao MR forbol miristato acetato (PMA) na concentração de  $1\mu\text{l/ml}$ . Como branco utilizar apenas o MR.

⇒ Após o tempo desejado (60 e 90 minutos), retirar o sobrenadante e passar para uma placa nova de 96 poços contendo  $10\mu\text{l}$  de solução aquosa de NaOH 1N em cada poço,

⇒ A oxidação do vermelho de fenol deverá ser quantificada através de leitura da absorbância em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 620 nm. Os resultados serão obtidos em densidade óptica e deverão ser comparados com uma curva padrão de concentrações variáveis de  $H_2O_2$ .

##### **Curva:**

⇒ Diluir o  $H_2O_2$  a 1:10, 1:100 e 1:1000 em água destilada e obter a concentração dessas soluções através de sua absorbância em 240 nm (em espectrofotômetro, utilizando cubeta de quartzo e lâmpada de deutério),

⇒ Utilizar a absorbância encontrada na solução 1:1000 na fórmula  $C = A/\epsilon$  (Onde  $A$  = absorbância,  $\epsilon = 39,58 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e  $C$  = concentração),

⇒ Preparar uma solução mãe (concentração de 1 mmolar) a partir da solução de  $H_2O_2$  1:100 em vermelho de fenol 1M diluído em HBSS,

⇒ Preparar soluções nas concentrações de 1, 10, 25 e 50 nmoles e colocá-los em banho maria à  $37^\circ\text{C}$ ,

⇒ Adicionar peroxidase na concentração final de 15U/ml e após 15 minutos adicionar  $10\mu\text{l}$  de NaOH a 1M,

⇒ Ler em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 620 nm utilizando como branco apenas a solução mãe.

**ANEXO 5 – DETECÇÃO DE ANION SUPERÓXIDO ( $O_2^-$ )****segundo Johnston, Godzik e Cohn, 1978**

⇒ Cultivar em placas de 96 poços ( $3-5 \times 10^5$  células/poço) pelo tempo determinado, OBS: caso o tratamento seja *in vivo* adicionar as células e deixar aderir por 15 minutos em estufa  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ .

⇒ Lavar o meio de cultivo com “Hank’s Buffered Salt Solution” (HBSS) a  $37^\circ\text{C}$ ,

⇒ Adicionar meio de reação contendo citocromo c  $80 \mu\text{M}$  dissolvido em HBSS (com ou sem drogas testadas), OBS: P.M. citocromo c = 12327

⇒ Como controle positivo adicionar ao meio de reação PMA na concentração de  $1 \mu\text{l/ml}$ , OBS: utilizar um poço como branco, contendo o meio de reação sem as células.

⇒ Após a incubação retirar  $100 \mu\text{l}$  do meio de reação e passar para uma placa nova e ler a absorbância em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de  $550\text{nm}$ .

⇒ Na leitura os poços devem ser zerados com o branco = HBSS + citocromo c

**Cálculo:**

⇒ Para determinar a concentração de  $O_2^-$  correspondente à concentração de citocromo c reduzido usa-se o Coeficiente de Extinção Molar ( $\epsilon = 2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ):

⇒  $C = A/\epsilon$

**ANEXO 6 – DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)****segundo Green et al., 1982**

⇒ Cultivar em placas de 96 poços ( $3-5 \times 10^5$  células/poço) pelo tempo determinado, OBS: caso o tratamento seja *in vivo* adicionar as células e deixar aderir por 15 minutos em estufa 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

⇒ Como controle positivo adicionar a alguns poços LPS (50ng/ml) e IFN- (26U/ml).

⇒ Retirar 100µl do sobrenadante e transferir para uma outra placa,

⇒ Adicionar 100µl do reagente de Griess (1:1 de Solução A: naftiletilenodiamino 0,1% em ácido fosfórico 5% e Solução B: Sulfonamina p-aminobenzeno 1% em ácido fosfórico 5%), OBS: As soluções separadas podem ser estocadas na geladeira por 1 mês, misturar apenas no momento da utilização.

⇒ Incubar 10 minutos a temperatura ambiente,

⇒ Ler a absorbância em leitor de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 550nm, OBS: utilizar um poço como branco, contendo apenas o reagente de Griess.

⇒ Calcular a concentração de NO, utilizando curva padrão de nitrito de sódio (10 – 80 µM).

## **ANEXO 7 – IMUNOMARCAÇÃO PARA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL (iNOS)**

⇒ Cultivar as células em garrafas de cultivo de 25 cm<sup>3</sup> (5 x 10<sup>6</sup> células por garrafa), OBS: caso o tratamento seja *in vivo*, fixar as células em tubos tipo eppendorff de 1 mL,

⇒ Fixar as células com glutaraldeído 0,05% e paraformaldeído 2% em PBS,

⇒ Raspar as células e adicioná-las em tubos tipo eppendorff de 1 ml,

⇒ Lavar e incubar as células em cloreto de amônio 50nM em PBS,

⇒ Incubar as células (2 x 10<sup>7</sup>) com anticorpo contra iNOS (Sigma) de camundongo, diluído 1:100 em Triton-X/PBS 0,01%, durante 1 hora a temperatura ambiente,

⇒ Lavar 2 vezes as células com PBS,

⇒ Incubar com Proteína A – gold 10 nm (Sigma) em Triton-X/PBS 0,01%, durante 30 minutos a temperatura ambiente,

⇒ Refixar as células em glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em PBS por 30 minutos,

⇒ Processar para MET,

⇒ Contrastar para MET,

⇒ Observar em MET.

## ***ANEXO 8 – FIXAÇÃO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)***

⇒ Fixar em glutaraldeído 1%, paraformaldeído 4% em tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M, pH 7,2 contendo 5% de sacarose durante uma hora a 4°C,

OBS: Nesse ponto do processamento pode-se parar o experimento armazenando-se as células em geladeira, por tempo indeterminado. Certificar-se que o líquido fixador esteja cobrindo todo o fundo da garrafa,

⇒ Nos casos de processamento para enzimas, pode-se lavar as células em tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M, pH 6,0 contendo 5% de sacarose, para retirar o precipitado inespecífico do cloreto de cério, antes de processar para MET,

⇒ Preparar o material para MET.

## **ANEXO 9 – PROCESSAMENTO PARA MET**

⇒ Raspar as garrafas de cultivo com canudinho de plástico cortados em forma de pazinha, ou com “scrap”,

⇒ Centrifugar os macrófagos por aproximadamente 5 minutos a 1500 rpm,

OBS: tomar o cuidado de usar sempre tubos, pipetas e ponteiros siliconizados.

**Após todos os próximos passos, o material deve ser centrifugado e o sobrenadante desprezado (lavado).**

⇒ Passar as células para tubos siliconizados de 1 ml (tipo eppendorff),

⇒ Lavar 2 vezes em tampão Cacodilato de Sódio 0.1M, pH 7.2,

⇒ Em capela, pós-fixar as células em tetróxido de Ósmio a 1% em tampão Cacodilato de Sódio 0.1M, pH 7.2, deixando por ½ ou 1 hora no escuro (tubos devem ser envolvidos em papel alumínio),

⇒ Lavar novamente com tampão cacodilato duas vezes,

⇒ Passar pela bateria de desidratação:

⇒ Lavar em acetona 70% por 15 minutos,

OBS: O experimento pode ser parado neste ponto e continuado no dia seguinte.

⇒ Adicionar novamente acetona 70% por 15 minutos,

⇒ Lavar em acetona 90% por 15 minutos,

⇒ Lavar em acetona 100% por 15 minutos,

⇒ Após a desidratação, transferir o material para cápsula BEEM, e lavar em acetona 100%,

⇒ Infiltrar o material em solução de acetona 2: epon 1 (Mistura I). Deixar OVERNIGHT,

⇒ No dia seguinte infiltrar na Mistura II: acetona 1: epon 1, deixar OVERDAY,

⇒ A mistura III (acetona 1: epon 2) deve ser infiltrada e deixada OVERNIGHT,

OBS: Em todas as etapas que exigem ser paradas, o material deve ser armazenado em geladeira devidamente fechado com parafilme.

⇒ Após essa etapa deve-se infiltrar epon puro e deixar OVERDAY. Emblocar e etiquetar. Deixar em estufa a 60°C por 3 ou 4 dias,

⇒ Obter cortes aleatórios, em intervalos de 0,5µ, em ultramicrotomo e em gradinhas de cobre de 300 mesh.

## **ANEXO 10 – CONTRASTAÇÃO PARA MET**

### **Preparo das soluções:**

#### **Acetato de Uranila**

⇒ Acetato de Uranila – 5g

⇒ Água destilada – 100ml

A solução deve ser filtrada e deixada no escuro. Normalmente a solução somente é utilizada 24 horas após seu preparo.

#### **Citrato de Chumbo (solução de Reynolds)**

⇒ Nitrato de Chumbo – 0,665g

⇒ Citrato de Sódio – 0,88g

⇒ Água destilada fervida – 15mL

⇒ NaOH 1N – 4mL

⇒ Água destilada – 50mL

Dissolver cada um dos componentes em 15mL de água destilada fervida misturando, posteriormente, as duas soluções em um balão volumétrico de 50mL. Como resultado da mistura das duas soluções iniciais obtemos um líquido branco e leitoso. Agitar vigorosamente a mistura por 30 minutos. Adicionar então 4mL de NaOH, recém preparada e agitar. A solução deverá ficar transparente e límpida. Completar o volume para 50mL com água destilada. O pH deve ficar próximo de 12.

OBS: A solução de Citrato de Chumbo deve ser distribuída em tubos de ensaio pequenos, com tampa de rosca que devem ser selados com parafilme e guardados na geladeira. Normalmente reservamos um único tubo que deve ficar na bancada de uso. Quando este tubo apresentar uma fina camada branca na superfície da solução ou nas paredes do tubo, deve-se descartá-lo e pegar um tubo novo. Normalmente a solução só poderá ser utilizada no dia seguinte ao seu preparo.

### **Contraste:**

⇒ Para o contraste usar uma placa de Petri forrada externamente com papel alumínio. Cobrir uma das partes internamente com parafilme e com papel filtro. Marcar nesse papel os números das gradinhas a serem contrastadas. OBS: A parte

brilhante da gradinha é a que contém o material e fica virada para cima, em contato com a gota.

⇒ Pingar uma gota de Acetato de Uranila sobre a gradinha deixando-a agir por 15 a 20 minutos. Lavar com água destilada, escoando pela pinça, sobre um becker limpo. O Acetato de Uranila não pode ser agitado e a solução deve ser retirada do meio do frasco.

⇒ Pingar a solução de Reynolds sobre o material, sendo o processo idêntico ao anterior. Essa solução deve ser límpida, transparente; caso esteja opaca deve ser desprezada.



**ANEXO 11 – LARANJA DE ACRIDINA PARA MICROSCOPIA CONFOCAL**

- ⇒ Cultivar as células ( $1 \times 10^6$  células/poço) em placas de 24 poços contendo lamínula estéril;
- ⇒ Após 48 horas de cultivo ou 15 minutos de adesão das células tratadas *in vivo*, retirar o meio de cultura e adicionar solução de laranja de acridina ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) em PBS;
- ⇒ Incubar por 20 minutos a  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ .
- ⇒ Retirar as lamínulas e colocá-las sobre uma gota de PBS estéril em lâmina;
- ⇒ Observar em microscópio confocal utilizando laser de Argônio (488nm).

***ANEXO 12 – DETECÇÃO DE CD74 (li) EM CITOMETRIA DE FLUXO***

⇒ Fixar as células com BD Cytotfix/Cytoperm kit (BD Bioscience), conforme instruções do fabricante;

⇒ Lavar e incubar com anticorpo monoclonal anti CD74 (li) conjugado com FITC (BD Bioscience) – 0,5 µg/10<sup>6</sup> célula – por 40 minutos a temperatura ambiente, no escuro;

⇒ Lavar e observar em citômetro de fluxo (FACScalibur).

***ANEXO 13 – DETECÇÃO DE CD74 (li) EM MET***

- ⇒ Fixar as células com BD Cytofix/Cytoperm kit (BD Bioscience), conforme instruções do fabricante;
- ⇒ Lavar e incubar com anticorpo monoclonal anti CD74 (li) purificado (BD Bioscience) – 0,5 µg/10<sup>6</sup> célula – por 30 minutos a temperatura ambiente;
- ⇒ Lavar e incubar com proteína A – gold 10nm (Sigma) por 30 minutos;
- ⇒ Lavar e processar para MET;
- ⇒ Contrastar;
- ⇒ Observar.

## **ANEXO 14 – MENSURAÇÃO DE CITOCINAS EM SOBRENADANTE**

### ***Mouse Th1/Th2 cytokine CBA – BD Pharmingen***

OBS: O procedimento para a análise das citocinas interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) produzidas pelos macrófagos e liberadas no sobrenadante da cultura, foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante do kit

⇒ Após 48 horas de cultivo em placa de 96 poços ( $5 \times 10^5$  células/poço) ou 15 minutos de adesão das células tratadas *in vivo*, retirar o sobrenadante celular e centrifugar para retirar as células presentes. A mensuração das citocinas é feita no sobrenadante.

⇒ Misturar as cinco soluções contendo os *beads* de captura do kit;

⇒ Adicionar 2,5  $\mu$ l de solução de *beads* em tubos de citômetro;

⇒ Adicionar 50  $\mu$ l do sobrenadante de cada poço aos tubos contendo a solução de *beads*;

⇒ Adicionar 2,5  $\mu$ l dos anticorpos contra as citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-5 IL-4, IL-2 (*mouse Th1/Th2 PE detection reagent*) conjugados com o ficoeritrina (PE);

⇒ Incubar por 2 horas no escuro;

⇒ Adicionar a cada tubo do experimento 100 $\mu$ l da solução de lavagem e leitura (*washing buffer*);

⇒ Centrifugar 1.300 rpm por 5 minutos;

⇒ Descartar o sobrenadante e adicionar 200 $\mu$ l de *washing buffer*;

⇒ Homogeneizar a solução em “vortex” e analisar imediatamente em citômetro de fluxo (FACSCalibur);

⇒ Analisar usando o programa BD CBA software e comparar uma curva de concentração de citocina fornecida no kit.

## **ANEXO 15 – EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE CÉLULAS ANIMAIS**

### ***RNeasy mini kit – Qiagen***

Observações importantes antes de iniciar o processo:

⇒ É essencial usar o número correto de células para se obter uma concentração e pureza altas de RNA com as colunas do RNeasy. O Mini Kit suporta  $5 \times 10^6$  até  $1 \times 10^7$ ;

⇒ Células podem ser guardadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para uso posterior, ou podem ser utilizadas logo após serem coletadas. O número de células deve ser obtido antes de serem congeladas. Essas devem ser descongeladas rapidamente a temperatura ambiente (ou calor da mão) e podem ser processadas – passo 2. O lisado homogeneizado em tampão RLT – passo 3, pode ser guardado a  $-70^{\circ}\text{C}$  por vários meses. Para processar o lisado, esse deve ser descongelado durante 15-20 minutos em banho maria a  $30^{\circ}\text{C}$ ;

⇒ Geralmente não é necessária a digestão com DNase;

⇒ O tampão RLT pode formar precipitado quando guardado. Caso necessário, esquentá-lo;

⇒ Adicionar 10  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol para cada ml de tampão RLT antes de usar;

⇒ Ao tampão RPE adicionar 4 volumes de etanol 100% (MERCK);

⇒ Todas as centrifugações devem ser feitas a temperatura ambiente.

### **Procedimentos:**

⇒ Coleta dos macrófagos segundo protocolo (RNase free);

⇒ Centrifugar em tubo Falcon 15 ml por 3 minutos a 2500RPM para formação do pellet;

⇒ Contar as células com auxílio da câmara de Neubauer;

⇒ Lisar as células pela adição de tampão RLT;

Células em pellets:

Tampão RLT $\mu$ l	Número de células no pellet
350	Até $5 \times 10^6$
600	$6 \times 10^6$ a $1 \times 10^7$

Células em monocamadas:

Tampão RLT $\mu$ l	Diâmetro da placa (cm)
350	$\leq 6$
600	6 – 10

- ⇒ Homogeneizar as células por pipetagem;
- ⇒ Adicionar 1 volume (igual ao da tabela) de etanol 70% ao lisado e misturar bem através de pipetagem. Não centrifugar;
- ⇒ Aplicar 700  $\mu$ l à coluna, incluindo qualquer precipitado que tenha se formado, em tubo de 2 ml. Centrifugar por 15 segundos a 8000 g ( $\cong$ 10000 RPM). Caso sobre amostra no tubo original repetir o processo. Descartar o que passou;
- ⇒ Adicionar 700  $\mu$ l de tampão RW1 à coluna. Centrifugar por 15 segundos a 8000 g ( $\cong$ 10000 RPM) para lavar a coluna. Descartar o que passou;
- ⇒ Adicionar 500  $\mu$ l de tampão RPE à coluna. Centrifugar por 15 segundos a 8000 g ( $\cong$ 10000 RPM) para lavar a coluna. Descartar o que passou;
- ⇒ Adicionar novamente 500  $\mu$ l de tampão RPE à coluna. Centrifugar por 2 minutos na velocidade máxima para secar a membrana da coluna. Descartar o que passou;
- ⇒ Para eluir, transferir a coluna para um novo tubo de coleção (do Kit). Pipetar o volume apropriado de água RNase free diretamente na membrana (30 – 50  $\mu$ l). Deixar 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugar por 1 minuto a 8000g ( $\cong$ 10000 RPM). Repetir esse passo para obter maior concentração de RNA final.

### ***ANEXO 16 – DOSAGEM DE RNA/DNA PELA DENSIDADE ÓTICA (DO)***

⇒ Diluir a amostra na proporção de 1:200, ou seja, 1 µl de amostra para 199 µl de água DEPC;

⇒ Ler em espectrofotômetro, múltipla leitura de comprimentos de onda (WL):

WL1	WL2	WL3	WL4
310nm	280nm	260nm	230nm
Sujeira	Proteína	RNA/DNA	Nucleotídeos livres

⇒ Deve ser usada cubeta de quartzo de 200 µl, a lâmpada de ultravioleta (UV) deve estar ligada e para o branco deve ser usada água DEPC.

#### **Cálculo para a concentração de RNA (C):**

$$C = DO \times 2 \times 200 \times 40 \text{ (ng/}\mu\text{l)}$$

Onde:

2 = fator de correção da passagem de luz. A luz passa ½ do normal, devido ao fato da cubeta ter apenas 200 µl

200 = diluição

40 = DO relativa ao RNA (caso quisesse calcular de DNA, esse valor seria 50)

## **ANEXO 17 – Gel de RNA**

- ⇒ Observações importantes antes de iniciar o processo:
- ⇒ Todo o material utilizado deve ser tratado para retirada de qualquer RNase. Isso inclui a cuba de corrida. O tratamento pode ser conseguido através de: Lavagem com álcool 70%; Lavagem com água DEPC na proporção de 1:1000 autoclavada; Lavagem com solução de água oxigenada 3% por 10 minutos a temperatura ambiente,
- ⇒ Todo o material após o tratamento deve ser lavado com água DEPC.

### **Soluções:**

#### Tampão 10x MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propano ácido sulfônico)

200mM MOPS (sigma M1254) -----20,9 g  
 50mM acetato de sódio pH 7,0 (PM 136,1) -----3,4 g  
 10mM EDTA (solução 0,5M) -----10 ml

⇒ O tampão deve ser autoclavado, e deve ser mantido em geladeira protegido da luz por papel alumínio.

⇒ O acetato deve ser dissolvido antes de acertar o pH, e esse deve ser preciso, pois RNA degrada facilmente em outro pH.

#### Tampão de amostra (TA) - preparar na hora do uso

	500 µl	100 µl
Formaldeído 37% -----	100 µl	20 µl
Formamida 80% deionizada -----	300 µl	60 µl
Tampão 10x -----	50 µl	10 µl
Corante -----	50 µl	10 µl

#### Corante (armazenar por vários meses à 4°C)

Tampão 1x  
 25% de glicerol  
 Azul de bromofenol (pitada com a ponteira)



Gel (RNA formaldehyde gel)

	150 ml	100ml	50ml
Agarose 1,2% -----	1,8 g	1,5g	0,75 g
Água DEPC -----	110 ml	73 ml	36,6 ml
Tampão 10 x -----	15 ml	10 ml	5 ml
Formaldeido -----	26 ml	18 ml	9 ml

⇒ Liquefazer a agarose em água DEPC no microondas, adicionar o tampão 10x. Resfriar até aproximadamente 60°C e adicionar o formaldeido sob capela.

Preparação da amostra:

⇒ Calcular o volume de amostra a ser aplicada no gel, sendo que este deve conter 5 ou 3 µg/µl de RNA

$V = 5000 \text{ ou } 3000 \text{ ng} / C$
--

Onde:

C = concentração de RNA em ng/µl

- ⇒ Adicionar 1 volume de TA;
- ⇒ Adicionar 2 µl de brometo de etídio a 10 µg/ml;
- ⇒ Aplicar aproximadamente 20 µl no gel (o gel deve estar submerso em tampão 10x)
- ⇒ Correr a 70 mV por aproximadamente 1 hora;
- ⇒ Observar o gel em luz UV.

***ANEXO 18 – IMUNOFENOTIPAGEM***

- ⇒ Retirar o lavado peritoneal;
- ⇒ Lavar e incubar com anticorpo monoclonal anti CD45, CD11b e CD3 conjugados com PE (BD Bioscience) – 0,5  $\mu\text{g}/10^6$  células – por 40 minutos a temperatura ambiente, no escuro;
- ⇒ Lavar e observar em citômetro de fluxo (FACScalibur).

**ANEXO 19 – APROVAÇÃO CEEA**

**Ministério da Educação**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**Setor de Ciências Biológicas**  
**Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa)**

**CERTIFICADO**

Nº 059

A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituída pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEEa, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas no "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care).

Processo nº: 2798/04-62 Data de Aprovação: 15/03/04 11ª RO

Projeto de Pesquisa Título: DETECÇÃO DE MOLÉCULAS E EXPRESSÃO GÊNICA EM MACRÓFAGOS TRATADOS COM CANOVA.

Autores: Dorly Freitas Buchi ((responsável) Carolina.CamardeOliveira (acadêmica)  
Marco Aurélio Krieger ( Co-orientador).

Departamento: BCEL

Curitiba, 15 de março de 2004.

  
Prof. Dr. SILVIO MARQUES ZANATA  
Secretário

  
Profa. Dra. ANETE CURTE FERRAZ  
Presidente